Monoklonale Antikörper gegen Pflanzenviren: Herstellung, Reinigung und Charakterisierung

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Ralf Georg Dietzgen
aus Freiburg

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543907_0043

Monoklonale Antikörper gegen Pflanzenviren: Herstellung, Reinigung und Charakterisierung

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Ralf Georg Dietzgen
aus Freiburg

1983

Tag der mündlichen Prüfung:	31. August 1983
Dekan:	Prof. Dr. K.P. Hadeler
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Sander
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. V. Braun

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Evamarie Sander am Institut für Biologie II, Arbeitsgruppe Phytopathologie und Pflanzenvirologie, der Universität Tübingen durchgeführt.

Frau Dr. E. Sander danke ich für die gute Beratung, grosszügige Unterstützung und fachliche Diskussion während der Durchführung der Arbeit.

Den Herren Professoren Dr. V. Braun, Dr. W. Seyffert und Dr. H. Zähner gilt mein Dank für die mir gewährte grosszügige Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Frau G. Eggers-Schumacher für technische Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bedanke ich mich bei Herrn Dr. H. Frank, Max-Planck-Institut für Virusforschung, und Herrn K. Boller, Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft, Tübingen.

Herrn Dr. P. Gugerli, Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, Nyon, Schweiz, danke ich für die Überlassung von Potato Leafroll Virus (PLRV), PLRV-infizierten *Physalis floridana* und Samen dieser Pflanze, sowie das meiner Arbeit entgegengebrachte Interesse.

Herrn Prof. Dr. G. Jung und Herrn J. Christner, Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, möchte ich für die Synthese und Kopplung des C-terminalen Peptids von TMV-Protein, sowie die anregende Diskussion danken.

UNIV. LEIDEN BIBL.

Frau Dr. B. Kindred, Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen, sowie der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, danke ich für die Überlassung von Versuchstieren.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Phytopathologie und Pflanzenvirologie möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre und das Interesse bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	E I N L E I T U N G	1
II.	M A T E R I A L UND M E T H O D E N	8
1.	M a t e r i a l	8
1.1	VIREN, WIRTSPFLANZEN UND VEKTOREN	8
1.2	ANTISEREN, ZELLINIE UND VERSUCHSTIERE	11
1.3	CHEMIKALIEN	13
1.4	PUFFER UND LÖSUNGEN	15
1.5	ZELLKULTURMEDIEN	19
1.6	GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL	21
2.	M e t h o d e n	23
2.1	VIRUSVERMEHRUNG	23
2.1.1	TMV	23
2.1.2	ArMV	24
2.1.3	PLRV	24
2.2	VIRUSREINIGUNG	25
2.2.1	TMV	26
2.2.2	ArMV	27
2.2.3	PLRV	28
2.3	CHARAKTERISIERUNG DER GEREINIGTEN VIREN	34
2.3.1	Spektroskopische Untersuchungen	34
2.3.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	35
2.4	ISOLIERUNG DES VIRALEN HÜLLPROTEINS	35
2.4.1	TMV-Protein	35
2.4.2	Tryptische Peptide des Hüllproteins von TMV	36
2.4.2.1	Herstellung und Reinigung tryptischer Peptide	37
2.4.2.2	Synthese und Kopplung des C-terminalen Tetrapeptids von TMV-Protein	39
2.4.3	ArMV-Protein	40

		Seite
2.5	IMMUNISIERUNG VON MÄUSEN	41
2.6	MONOSPEZIFISCHE ANTIKÖRPER GEGEN TMV	43
2.7	ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)	44
2.7.1	ELISA zum Nachweis von viralen Antigenen	47
2.7.1.1	Nachweis von PLRV in infizierten *Physalis floridana*	47
2.7.1.2	Nachweis antigener Determinanten auf Peptiden von TMV-Protein	48
2.7.1.3	Nachweis von TMV mit poly- und monoklonalen Antikörpern	50
2.7.2	ELISA zum Nachweis von virusspezifischen Antikörpern	50
2.7.2.1	Nachweis von Antikörpern im Serum	52
2.7.2.2	Nachweis von Antikörpern in Hybridoma-Kulturüberständen	56
2.7.2.3	ELISA zur Bestimmung der Spezifität monoklonaler Antikörper	58
2.7.2.4	ELISA zur Bestimmung der Immunoglobulin-Klassen und -Subklassen von monoklonalen Antikörpern	61
2.8	FUSION VON MAUS-MYELOMZELLEN MIT MILZZELLEN VON PFLANZENVIRUS-IMMUNISIERTEN MÄUSEN	63
2.9	SELEKTION, KLONIERUNG UND KULTUR VON ANTIKÖRPER-SEKRETIERENDEN HYBRIDOMAS	66
2.9.1	Klonierung durch limiting dilution	67
2.9.2	Konservierung von Hybridomas	68
2.10	HERSTELLUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER *IN VITRO* UND DEREN REINIGUNG	69
2.10.1	Fällung monoklonaler Antikörper aus Kulturmedium mit Ammoniumsulfat	70
2.10.2	Reinigung monoklonaler Antikörper durch Affinitäts-Chromatographie an Protein A -Sepharose	71
2.11	CHARAKTERISIERUNG VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN	72
2.11.1	Homogenität der Hybridomalinien	72
2.11.2	Bestimmung des Antikörper-Isotyps	72

		Seite
2.11.3	Bestimmung der Antikörper-Spezifität	73
2.11.4	Neutralisation der Infektiosität von TMV	73
III.	E R G E B N I S S E	75
1.	VIRUSREINIGUNG UND -CHARAKTERISIERUNG	75
1.1	TMV	75
1.2	ArMV	77
1.3	PLRV	81
2.	REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES TMV-HÜLLPROTEINS UND DESSEN TRYPTISCHER PEPTIDE	85
2.1	Hüllproteine der isolierten TMV-Stämme	85
2.2	Tryptische Peptide des Hüllproteins von TMV *vulgare* (TMVP)	87
3.	SEROLOGISCHE REAKTIVITÄT DES SYNTHETISIERTEN C-TERMINALEN TETRAPEPTIDS VON TMVP	89
4.	IMMUNISIERUNG VON MÄUSEN MIT DEN GEREINIGTEN VIREN UND BESTIMMUNG DES VIRUSSPEZIFISCHEN ANTIKÖRPER-TITERS	100
5.	HERSTELLUNG, SELEKTION UND KLONIERUNG VON VIRUSSPEZIFISCHE-ANTIKÖRPER-SEKRETIERENDEN HYBRIDOMA-KULTUREN	103
5.1	TMV-Antikörper-sekretierende Hybridomas	103
5.2	ArMV-Antikörper-sekretierende Hybridomas	111
5.3	PLRV-Antikörper-sekretierende Hybridomas	113
6.	ANREICHERUNG UND REINIGUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER	115
7.	CHARAKTERISIERUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER GEGEN T M V	124
7.1	Immunoglobulin-Klassen und -Subklassen	124

		Seite
7.2	ELISA zur Bestimmung der Spezifität von MCA gegen TMV	125
7.3	Spezifität der monoklonalen Antikörper	130
7.4	Neutralisation der Infektiosität von TMV mit MCA	142
7.5	Charakterisierung einer antigenen Determinante anhand der Reaktivität monoklonaler Antikörper	151
8.	CHARAKTERISIERUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER GEGEN A r M V UND P L R V	154
8.1	Immunoglobulin-Klassen und -Subklassen	154
8.2	Spezifität der monoklonalen Antikörper	154
IV.	D I S K U S S I O N	164
V.	Z U S A M M E N F A S S U N G	191
VI.	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	193
VII.	A B K Ü R Z U N G E N UND G L O S S A R	203
1.	A b k ü r z u n g e n	203
2.	G l o s s a r	205

I. EINLEITUNG

In Antiseren enthaltene polyklonale Antikörper sind bisher vielfach als sensitive und selektive Werkzeuge zur Strukturanalyse und serologischen Diagnose von Pflanzenviren verwendet worden (Clark, 1981; Walter & Sander, 1979; Altschuh & van Regenmortel, 1982). Aufgrund der Heterogenität konventioneller Antiseren, die Produkte von tausenden verschiedener Antikörper-sekretierender Plasmazellklone enthalten, die auch gegen Verunreinigungen des zur Immunisierung verwendeten Antigens, z.B. mit Antigenen der Wirtspflanze, gerichtet sein können (Goding, 1980), sind die aus solchen Analysen erhaltenen Informationen jedoch begrenzt.
Selbst durch Kreuzadsorption polyklonaler Antiseren erhaltene monospezifische Antiseren enthalten eine Rest-Heterogenität, die sich besonders bemerkbar macht, wenn die Antigene stark kreuzreaktiv sind, oder die Zahl und Struktur der antigenen Determination (Epitope) unbekannt ist.

Durch die Methode der somatischen Zellhybridisierung (Köhler & Milstein, 1975, 1976) können einzelne immunkompetente Lymphozyten durch Fusion mit Myelomzellen "unsterblich" gemacht und von der Vielzahl verschiedener Antikörper-sekretierender Klone in einem immunisierten Warmblüter abgetrennt werden. Es war ein Ziel dieser Arbeit, die Produktion von Antikörpern *in vitro* durch in Suspensionskultur wachsende Hybridoma-Klone zu etablieren, um einmal auf die Herstellung von Antiseren in Warmblütern verzichten zu können.

Die durch diese Methode erhaltenen monoklonalen Antikörper zeichnen sich durch ihre Homogenität und definierte Spezifität für jeweils nur eine einzige antigene Determinante eines Antigens aus, und sind daher bei der Analyse der Feinstruktur und der Bestimmung der Funktion antigener Regionen den polyklonalen Antikörpern überlegen.

Durch die Verfügbarkeit beliebiger Mengen homogener monoklonaler Antikörper definierter Spezifität, konstanter Eigenschaften und standardisierter Qualität, eröffnen sich neue Wege zur Analyse und Diagnose von Viren:

1) Identifizierung, Lokalisierung und Strukturaufklärung antigener Bereiche des viralen Hüllproteins.

2) Erkennung von eventuell allen Stämmen eines Virus gemeinsamen, gruppenspezifischen Epitopen zur serologischen Erfassung vieler Stämme einer Virusgruppe.

3) Differenzierung der Stämme einer Virusgruppe anhand von monoklonalen Antikörpern gegen stammspezifische antigene Determinanten.

4) Taxonomische und epidemiologische Untersuchungen von Viren aufgrund der Differenzierung antigener Unterschiede zwischen Virus-Isolation (serologische Typisierung).

5) Analyse von viralem Polymorphismus und Evolution anhand von Kreuzreaktivitäten verschiedener Viren mit einem monoklonalen Antikörper.

6) Spezifischere und empfindlichere Diagnose von Viren unter standardisierten und reproduzierbaren Bedingungen.

In der Pflanzenvirologie wird mit monoklonalen Antikörpern Neuland betreten.

Im Bereich der animal- und humanpathogenen Viren sind jedoch die Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern über die antigenen Verwandtschaften viraler Proteine, die Architektur einzelner Proteine (Yewdell & Gerhard, 1981) und die serologische Typisierung von Viren, wie z.B. dem Influenza Virus (Gerhard *et al.*, 1981) schon weit fortgeschritten.

In Analogie hierzu war es ein Anliegen der vorliegenden Arbeit, mit monoklonalen Antikörpern auch im Bereich der Pflanzenvirologie neue, eingehendere Kenntnisse über die antigene Struktur von Viren zu erhalten, sowie die Stammdifferenzierung und serologische Diagnose, die oft durch unspezifische Reaktionen und die unterschiedliche Qualität konventioneller Antiseren beeinflusst wurde, zu verbessern.

Über die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen ein Pflanzenvirus wurde erstmals auf dem V. Internationalen Virologie-Kongress in Strassburg (Dietzgen & Sander, 1981) am Modell des stäbchenförmigen, aus identischen Hüllprotein-Untereinheiten bekannter Aminosäuresequenz und RNA zusammengesetzten Tabak Mosaik Virus (TMV), eines der best untersuchten Viren (Tobamovirus-Gruppe) (Hirth & Richards, 1981; van Regenmortel, 1982). berichtet.

Die Möglichkeit monoklonale Antikörper auch gegen andere Pflanzenviren herzustellen, sollte nun mit zwei ikosaedrischen Viren, die zur Gruppe der Luteoviren bzw. Nepoviren zählen, überprüft werden.

Dabei wurde als Modell für ein genetisches Einkomponenten-Virus, das Potato Leafroll Virus (PLRV) und als Modell für ein genetisches Mehrkomponenten-Virus mit drei Partikeln, das Arabis Mosaik Virus (ArMV) gewählt. Die Kriterien für diese Wahl waren 1) die wirtschaftliche Bedeutung beider Viren als Pathogene landwirtschaftlicher Nutzpflanzen, 2) das bisher geringe Wissen über Struktur und antigene Determinanten beider Viren und 3) ihre Obertragbarkeit durch einen Vektor, Blattläuse bei PLRV bzw. Nematoden bei ArMV, um mit monoklonalen Antikörpern die Auffindung eventuell für die Obertragbarkeit massgeblicher Hüllprotein-Strukturen zu ermöglichen.

Ein Vorteil der Hybridoma-Technik liegt darin, auch grob gereinigte Antigen-Präparationen zur Immunisierung verwenden zu können und durch Screening die Hybridomas aufzufinden, welche die gewünschten Antikörper produzieren. Hierbei ist jedoch häufig die Ausbeute solcher Hybridomas je Fusion gering (Gurney *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1981), und gegen nur wenig vertretene antigene Determinanten werden dabei meist keine Antikörper produziert. Dem kann entgegen gewirkt, d.h. die Ausbeute von virus-spezifische-Antikörper-produzierenden Hybridomas angehoben werden, durch Immunisierung mit einer hochgereinigten Virus-Präparation (Dietzgen & Sander, 1982). Offensichtlich werden damit viele, auch die für eine umfassende Strukturanalyse der Viren notwendigen, aber nur gegen selten vorkommende Epitope (minor determinants) gerichtete, aktivierten B-Lymphozyten erzeugt. Ein möglichst breites Spektrum an Spezifitäten der monoklonalen Antikörper zu erzeugen, war ein Ziel dieser Arbeit.

Im Gegensatz zu Halk *et al.* (1982 a, b), die zur Immunisierung eine Mischung von 2-4 gereinigten Viren verwendeten, wurde bei der vorliegenden Arbeit zur Immunisierung jeweils nur ein Virus verwendet und ausserdem die immunologisch besonders reaktiven Mäuse des STU-Stammes benutzt (Schäfer, 1979). Damit sollte das Screening erleichtert und ein Selektionsverlust von mit mehreren Viren kreuzreagierenden monoklonalen Antikörpern vermieden, sowie die Zahl virusspezifischer,immunkompetenter Milzzellen erhöht werden.

Ausserdem war es ein Anliegen dieser Arbeit, die Produktion der monoklonalen Antikörper *in vitro*, also in Kulturmedium unter kontrollierten Bedingungen, anstatt als Ascites in Mäusen, zu entwickeln, um 1) die aufwendige Versuchstierhaltung zur Ascites-Bildung zu umgehen, und um 2) nach der Reinigung nur homogene monoklonale Antikörper, ohne mögliche Kontamination durch Mäuse-Antikörper unbekannter Spezifität zu erhalten (Underwood *et al.*, 1983).

Aufbauend auf den vorhandenen Antikörper-sekretierenden Hybridoma-Kulturen und methodischen Kenntnissen (Dietzgen, 1981) sollten in der vorliegenden Arbeit weitere Antikörper-sekretierende Hybridoma-Kulturen hergestellt, mehrfach kloniert, stabile Klone in Massenkulturen zur Produktion monoklonaler Antikörper vermehrt und der ELISA zum Auffinden von Hybridoma-Antikörpern optimiert werden. Ebenfalls sollte die Antigen-Spezifität der monoklonalen Antikörper anhand ihrer Reaktivität im indirekten ELISA (Koenig, 1981) ermittelt werden.

Ob es gemeinsame, gruppenspezifische Epitope verschiedener Virusstämme, sowie stammspezifische Epitope bei den untersuchten Viren gibt, sollte anhand der Reaktivität mit verschiedenen, unterschiedlich nah verwandten Stämmen untersucht werden. Mit solchen monoklonalen Antikörpern wäre die serologische Diagnose ganzer Virusgruppen oder einzelner Stämme möglich.

Ob durch die Immunisierung mit kompletten Virus-Partikeln neben Antikörpern gegen das Nukleokapsid auch Antikörper gegen, nur im isolierten Hüllprotein zugängliche Epitope gebildet werden, wie dies für TMV schon gezeigt werden konnte (Dietzgen & Sander, 1982), sollte anhand der Reaktivität der monoklonalen Antikörper mit den isolierten Hüllproteinen, sowie dem Nukleokapsid der Viren untersucht werden.

Anhand der Kreuzreaktivitäten mit anderen Viren sollten mögliche, bisher mit polyklonalen Antikörpern noch nicht entdeckte, serologische Verwandtschaften aufgefunden werden.

Die Lokalisierung von Epitopen im TMV-Hüllprotein und die antigene Bedeutung von Aminosäuresequenzen sollte anhand der Reaktivität monoklonaler Antikörper mit isolierten nativen, tryptischen, sowie chemisch synthetisierten Peptiden festgestellt werden. Dazu wurde das C-terminale Tetrapeptid von TMVP chemisch synthetisiert und allein, sowie an verschiedene polymere Träger gebunden, auf seine serologische Reaktivität mit polyklonalen Antikörpern gegen komplette TMV-Partikeln untersucht, um die Oberflächenlokalisation dieses Peptids im Hüllprotein von TMV zu bestätigen, und um das Konjugat mit der höchsten Reaktivität zum Auffinden der gegen diese Region gerichteten monoklonalen Antikörper auszuwählen.

Ob es einen beim Infektionsvorgang von TMV kritischen Bereich des Hüllproteins gibt, der für die erfolgreiche Infektion frei bleiben muss und bei Blockierung mit Antikörpern zu einer spezifischen Neutralisation der Infektiosität des Virus führt, sollte anhand der Reaktion von definierten monoklonalen Antikörpern mit TMV im Biotest festgestellt werden.

Die so charakterisierten monoklonalen Antikörper können in weiterführenden Untersuchungen zur Analyse der Struktur und Funktion der viralen Hüllproteine und zur Verbesserung der Diagnose von Viren Verwendung finden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 VIREN, WIRTSPFLANZEN UND VEKTOREN

Tabak Mosaik Virus (TMV)

Als Antigen bei der Herstellung monoklonaler Antikörper wurde TMV *vulgare* (Typstamm, TMV), Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, verwendet.

Für Spezifitätsuntersuchungen der monoklonalen Antikörper wurden verwendet:

- TMV-*dahlemense* (TMV-*d*), (Melchers, 1940), synonym: Tomatenmosaikvirus, Stamm *dahlemense*; Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen
- TMV-Holmes'Ribgrass (TMV-HR), synonym: Ribgrassmosaikvirus, gefriergetrocknetes Blattmaterial von infizierten *Nicotiana tabacum* L. cv Turkish mit dem ATCC-Stamm ePV 46, isoliert von *Plantago lanceolata* L., 1941 in New Jersey, USA.
- TMV *vulgare* (TMV)

Alle drei TMV-Stämme wurden auf *Nicotiana tabacum* cv Samsun vermehrt. Für Biotests zur Feststellung der Infektiosität sowie deren Neutralisation durch spezifische Antikörper wurde *Nicotiana tabacum* cv Xanthi nc verwendet.

TMV gehört der Gruppe der Tobamoviren (Tobacco mosaic viruses) an (Gibbs, 1977; Matthews, 1982).

Die mechanisch übertragbaren, stäbchenförmigen Viruspartikeln (300 x 18 nm) setzen sich aus einem Molekül linearer, einzelsträngiger RNA (MG = 2 x 10^6 dalton) und 2130 identischen Hüllprotein-Untereinheiten (MG = 17 - 18 x 10^3 dalton) zusammen (van Regenmortel, 1981). TMV verursacht wirtschaftliche Schäden bei Tabak, Tomaten und vielen anderen landwirtschaftlichen, sowie gärtnerischen Nutzpflanzen. Der wirtschaftliche Schaden kann je nach Virulenz des Stammes erheblich sein.

Arabis Mosaik Virus (ArMV)

Als Antigen bei der Herstellung monoklonaler Antikörper wurde der ATCC-Stamm PV 192 (R.W. Fulton Stamm AB 10) (gefriergetrocknetes Blattmaterial von *Nicotiana repanda*), isoliert von B.D. Harrison aus der Zuckerrübe, 1958 in England, verwendet (Harrison & Nixon, 1960).

Zur Untersuchung der Antigen-Spezifität der monoklonalen Antikörper wurden der ATCC-Stamm PV 192, sowie folgende ArMV-Isolate verwendet: ArMV-S (aus der Erdbeere) und ArMV-ivy (aus Efeu) (East Malling Research Station, Maidstone, England) sowie ArMV-E, ein deutsches Isolat aus Erdbeeren (Krczal, 1965).

Zur Virusvermehrung wurden Gurken (*Cucumis sativus*), Typ MR 17, sowie *Petunia hybrida* verwendet. Die Infektiosität der gereinigten Viren wurde im Biotest auf Gurken überprüft.

ArMV gehört zur Gruppe der Nepoviren (nematode polyhedral viruses) (Murant, 1981; Matthews, 1982).

Die ikosaedrischen Viruspartikeln (Ø 28 nm) können mechanisch, durch Samen oder durch Bodennematoden übertragen werden. Das Genom besteht aus 2 Spezies linearer, einzelsträngiger RNA mit MG = 2.4 x 10^6 dalton (d) bzw. 1.4 x 10^6 d. Die Virionen besitzen einen Typ von Hüllprotein (MG = 55-60 x 10^3) und sedimentieren in 3 Komponenten. Die Wirtspflanzen von ArMV sind u.a. Hopfen, Himbeeren, Erdbeeren, Süsskirschen, Zuckerrüben, Rhabarber und Gurken, wobei der Befall bei Himbeeren und Erdbeeren bis zu totalen Ernteausfällen führen kann.

Potato Leafroll Virus (PLRV) (Kartoffel Blattroll Virus)

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurde ein schweizer Isolat von P. Gugerli, aufgenommen von infizierten Kartoffelpflanzen durch die grüne Pfirsichblattlaus (*Myzus persicae* Sulz.) und zur Vermehrung übertragen auf *Physalis floridana* Rdbg. (Gugerli, 1979), als Antigen verwendet.

Zur Untersuchung der Antigen-Spezifität monoklonaler Antikörper wurde das schweizer PLRV-Isolat (PLRV-CH), sowie weltweite Isolate des Internationalen Kartoffelzentrums (CIP) in Lima, Peru, die uns freundlicherweise von P. Gugerli übersandt wurden, verwendet.

PLRV gehört zur Gruppe der Luteoviren (latein. *luteus* = gelb; Gelbverfärbungen von infizierten Wirtspflanzen). Die ikosaedrischen Viruspartikeln (Ø 24 nm) sind im Phloem infizierter Pflanzen lokalisiert und können zirkulativ persistent durch Aphidenvektoren übertragen werden.

Die Partikeln bestehen aus einer Spezies einzelsträngiger RNA (MG = 2 x 10^6 d) und einem Typ von Hüllprotein (MG = 24 x 10^3) (Rowhani & Stace-Smith, 1979; Rochow & Duffus, 1981; Matthews, 1982). Ein Befall mit PLRV kann den Bestand an Kartoffeln und Tomaten schädigen und bei Kartoffeln bis zum völligen Ertragsverlust führen.

1.2 ANTISEREN

- Affinitätsgereinigte Antikörper gegen Kaninchen-IgG und Maus-IgG (H+L), Alkalische Phosphatase konjugiert (Zymed Laboratories, Kalifornien, USA)
  → Bestimmung von Spezifität und Subklasse der MCA.
- Subklassen-spezifische Antikörper gegen Maus-IgA, IgM, IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3, kappa- und lambda-leichte Kette (vom Kaninchen), (Zymed Lab.)
  → Bestimmung der Ig-Klassen und -Subklassen von MCA.
- Gereinigte Maus-Myelomaproteine: IgA, IgM, IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3, κ- und λ-leichte Kette (Zymed Lab.)
  → Positivkontrolle für den ELISA zur Subklassen-Bestimmung.
- Normalserum vom Kaninchen (Zymed Lab.)
  → Subklassen-ELISA

  und (Flow Lab.)

  → Reinigung von γ-Globulinen für den Biotest zur Neutralisation von TMV.
- Affinitätsgereinigte Antikörper gegen Maus-IgG (H+L), (Kent Lab., Washington, USA)
  → Nachweis von Mäuse-Antikörpern in Seren und Hybridoma-Kulturüberständen.

- Antiseren gegen Maus-γ-Globulin (vom Kaninchen) und gegen Kaninchen-γ-Globulin (v.d. Ziege) (Behringwerke, Marburg)
  → Nachweis von Antikörpern im Serum von Mäusen und Kaninchen, sowie Bestimmung der Spezifität von MCA.
- Antiserum gegen PLRV (v. Kaninchen) (Inotech, Basel); Antiserum und γ-Globuline gegen PLRV (v. Kaninchen) (P. Gugerli).
  → Nachweis von PLRV-infizierten *Physalis floridana* und PLRV-Antikörper-sekretierenden Hybridomas.
- Antiserum und γ-Globuline gegen TMV von einem hyperimmunisierten Kaninchen
  → Kontrollexperimente und Herstellung monospezifischer Antikörper gegen TMV.
- Antiseren gegen TMV, ArMV und PLRV aus hyperimmunisierten Mäusen
  → Positivkontrollen im ELISA zum Nachweis von monoklonalen Antikörpern.
- Antiserum gegen ArMV (v. Kaninchen), ATCC-PVAS 192
  → Bindung von ArMV aus infiziertem Pflanzensaft beim Nachweis von ArMV-Antikörpern im Serum und Hybridoma-Kulturüberstand.
- γ-Globuline aus Kaninchen-Antiserum gegen PVX
  → Virus-Neutralisation.
- Normalserum von STU-Mäusen
  → Kontrollexperimente

Wenn nicht anders angegeben, sind die aufgeführten polyklonalen Seren selbst hergestellt worden.

ZELLINIE

Maus-Myelomzellinie P3-NS1/1-Ag4-1

VERSUCHSTIERE

Mäuse des Stammes STU (Schäfer, 1979)

1.3 CHEMIKALIEN

Albumin aus Rinderserum	rein, 92% min. lyophilisiert	Serva, Heidelberg
Ammoniaklösung (NH_4OH)	min. 25%, p.a.	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	p.a.	Serva
L-Ascorbinsäure	p.a.	Merck; Roth, Karlsruhe
n-Butanol	reinst	Merck
Caesiumchlorid	p.a.	Merck
Calciumchlorid x $2H_2O$	p.a.	Merck
Chloroform	reinst	Merck
Citronensäure-1-hydrat	reinst	Merck
Diethylether	reinst	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	reinst	Serva
Driselase		Fluka, Schweiz
Dulbecco's Modifikation von Eagle's Medium (DMEM)	10x konz. steril	Flow, Meckenheim Seromed, München
Essigsäure	100%, p.a.	Merck
Ethanol, vergällt	96%, p.a.	Merck
Fluorinert		ISCO, Nebraska
Fötales Kälberserum HY-Clone Nr. 165c	steril, Mykoplasma-frei	Paesel, Frankfurt
Freund'sches Adjuvans complete		DIFCO, Michigan
Freund'sches Adjuvans incomplete		GIBCO, N.Y.
Glycerin	doppelt dest. reinst	Merck
Glutamin (200mM)	steril	Flow

Glutaraldehyd	reinst; 25%	Serva
Glycin	p.a.	Merck
Harnstoff	p.a.	Merck
Hypoxanthin-Thymidin-(HT-) Konzentrat	50x, steril	Boehringer, Mannheim
Hypoxanthin-Thymidin-Aminopterin (HAT) - Konzentrat	50x, steril	Boehringer
Isoamylalkohol	p.a.	Merck
Kaliumchlorid	p.a.	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	p.a.	Merck
Kaliumhydroxid-Plätzchen	p.a.	Merck
Korund 400 mesh		Fa. Baumann, Metzingen
Magnesiumchlorid x $6H_2O$	p.a.	Merck
2-Mercaptoethanol	p.a.	Merck
Natriumacetat x $3H_2O$	krist., p.a.	Merck
Natriumazid	reinst	Serva
Natriumbicarbonat	7.5% Lösung steril	Flow
Natriumcarbonat	p.a.	Merck
Natriumchlorid	p.a.	Merck
Natriumhydrogencarbonat	p.a.	Merck
di-Natriumhydrogen-phosphat x $12H_2O$	p.a.	Merck
Natriumhydroxid-Plätz-chen	p.a.	Merck
NCTC 135-Medium	steril	Flow
p-Nitrophenylphosphat Tabletten je 5 mg		Sigma, München
Paraffin, flüssig		Merck
Penicillin-/Streptomycin-Lösung (10 000 U/ 10 000 µg/ml)		Serva
Phosphatase, alkalische Typ VII-S, aus Kälber-darm	E.C.3.1.3.1 1 000 U/mg	Sigma
Phosphowolframsäure	für die Elek-tronenmikros-kopie	Schuchardt, München

Polyethylenglykol 4 000; 6 000		Serva; Fluka
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	MG 25-30 000	Merck
Protein A - Sepharose		Pharmacia, Freiburg
Salzsäure, min. 32%	p.a.	Merck
Sephadex G50		Pharmacia
Sepharose-6B		Pharmacia
Sucrose für Dichte-gradienten	purum	Roth
Thioglykolsäure	purum	Fluka
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan		Merck
Triton X-100	rein	Serva
Trypanblau		Merck
Trypsin aus Kälberpancreas Typ III, 2x krist. 12 000 BAEE units/mg Protein	E.C.3.4.21.4	Sigma
Tween 20	rein	Serva
Uranylacetat	p.a.	Merck
Zinkchlorid	p.a.	Merck

1.4 PUFFER UND LÖSUNGEN

1.4.1 Sörensen-Phosphatpuffer (SPP) (Geigy, 1968)

0.01 M SPP, pH 7.2
→ Reinigung der TMV-Stämme und Isolierung tryptischer Peptide

0.02 M SPP, pH 6.0
→ Virus-Neutralisationstest

0.033 M SPP, pH 7.5
→ ArMV-Reinigung

0.5 M SPP, pH 7.2 + 1% Mercaptoethanol
→ Reinigung der TMV-Stämme

0.1 M SPP, pH 8.0
→ Isolierung von ArMV-Protein

0.1 M SPP, pH 8.0 + 10 mM NaN_3

0.5 M SPP, pH 8.0 + 10 mM NaN_3
→ Reinigung von monoklonalen Antikörpern durch Affinitäts-Chromatographie an Protein A - Sepharose

1.4.2 McIlvaine Citronensäure-Phosphat-Puffer (CPP) (Geigy, 1968)

→ PLRV-Reinigung
0.16 M CPP, pH 6.0 + 0.2% Thioglykolsäure
(= Homogenisierungspuffer)
0.045 M CPP, pH 7.0 + 0.2% Mercaptoethanol
0.045 M CPP, pH 7.0 + 0.2% Mercaptoethanol
+ 1% Triton X-100
0.018 M CPP, pH 7.0

1.4.3 Puffer für den Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Clark & Adams, 1976)

Phosphat gepufferte Saline (PBS), pH 7.4

8.0 g Natriumchlorid
0.2 g Kaliumhydrogenphosphat
2.9 g di-Natriumhydrogenphosphat x 12 H_2O
0.2 g Kaliumchlorid
aufgefüllt auf 1000 ml mit dest. Wasser

Coating Puffer (CP), pH 9.6

1.59 g Natriumcarbonat
2.93 g Natriumhydrogencarbonat
0.2 g Natriumazid
pH 9.6 mit 100% Essigsäure eingestellt
aufgefüllt auf 1000 ml mit dest. Wasser

Waschpuffer: PBS-Tween

PBS, pH 7.4 + 0.05% Tween 20

Probenpuffer

PBS-Tween + 2% Polyvinylpyrrolidon (PVP), pH 6.0

Puffer für Enzym-markierte Antikörper (EMA)

PBS-Tween + 2% PVP + 0.2% Albumin aus Rinderserum (RSA), pH 7.4

Substratpuffer, pH 10.5

7.51 g Glycin
1.0 ml 1 M Magnesiumchlorid
1.0 ml 0.1 M Zinkchlorid
0.2 g Natriumazid
auf 1000 ml mit dest. Wasser aufgefüllt
pH 10.5 mit 1N Kaliumhydroxid eingestellt

1.4.4 Sonstige Puffer

Dulbecco's PBS, pH 7.2

→ Zellfusion

Lösung A: 8.0 g Natriumchlorid
0.2 g Kaliumchlorid
1.15 g di-Natriumhydrogenphosphat
0.2 g Kaliumhydrogenphosphat
in 750 ml bidest Wasser gelöst und pH 7.2 eingestellt

Lösung B: 0.1 g Magnesiumchlorid x 6 H_2O
0.13 g Calciumchlorid x 2 H_2O
in 250 ml bidest Wasser gelöst und pH 7.2 eingestellt

Beide Lösungen wurden getrennt autoklaviert und dann vereinigt.

0.05 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0

→ zur Homogenisierung von ArMV-infiziertem Pflanzenmaterial zur Vermehrung (Waterworth, 1975).

20 mM Tris-HCl + 40 mM NaCl, pH 7.8
20 mM Tris-HCl + 20 mM NaCl, pH 7.8
→ zur Fällung von Kulturüberständen

1.4.5 Lösungen

- 0.34 M Sucrose-Lösung
  → Isolierung peritonealer Makrophagen.
- 0.4 M NaCl/40% PEG 6 000
  → PLRV-Reinigung.

- 50% (w/w) PEG 4 000-Lösung
  → Zellfusion
  30 g PEG 4 000 wurden durch Autoklavieren sterilisiert und verflüssigt. Nach dem Abkühlen auf 45-50°C wurde 30 ml steriles DMEM-Serumfrei + 15% DMSO (37°C) zugegeben, gemischt und in Portionen zu 1-2 ml bei 20°C im Dunkeln gelagert.

- 0.1 M Essigsäure + 0.15 M NaCl
  → Elution von IgG von Protein A - Sepharose

- 1% Trypanblau/DPBS
  → Anfärbung abgestorbener Zellen

- 0.85% Saline
  → ELISA und Immunisierung

- 0.1% NH_4OH
  → Isolierung tryptischer Peptide von TMVP

- Gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung
  → Präzipitation von Globulinen aus Hybridoma-Kulturüberständen.
  1 000 g $(NH_4)_2SO_4$ und 1l dest. Wasser wurden 8 h bei 20-22°C gerührt, anschliessend über Nacht bei 4°C inkubiert und der pH mit 30% (w/v) NaOH auf 7.0-7.1 eingestellt.

1.5 MEDIEN FÜR ZELLKULTUREN

Die zur Selektion von Hybridomas, sowie zum Wachstum von Hybridomas und Myelomzellen verwendeten Kulturmedien sind in Tab. 1a zusammengestellt.

Tabelle 1a: Zusammensetzung von Zellkulturmedien

Material	HAT-DMEM + 20% FCS	HT-DMEM + 20% FCS	DMEM + 20% FCS	DMEM + 15% FCS	DMEM-Serumfrei
H_2O bidest	295 ml	295 ml	305 ml	330 ml	405 ml
DMEM (10x)	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml
Natriumbicarbonat (7.5%) (Endkonz.: 3.7 g/l)	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml
Glutamin (200 mM) (Endkonz.: 0.584 g/l)	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Penicillin/Streptomycin (10 000 U/10 000 µg/ml)	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
2-Mercaptoethanol ($2x10^{-3}$ M) (Endkonz.: $2x10^{-5}$ M)	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Fötales Kälberserum (FCS)	100 ml	100 ml	100 ml	75 ml	-
HAT-Konzentrat (50x)	10 ml	-	-	-	-
HT-Konzentrat (50x)	-	10 ml	-	-	-

Die angegebenen Mengen gelten für die Herstellung von jeweils 500 ml Medium

DMEM = Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium; HAT = Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin;

HT = Hypoxanthin-Thymidin

1.6 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL

Absaugpumpe für Flüssigkeiten	
Begasungsbrutschränke Typ B 5060 EC/CO_2	Heraeus, Hanau
Cell production roller apparatus	Bellco Glass, USA
Dialysenschläuche Visking 8/32, 20/32, 36/32	Serva, Heidelberg
Elektronenmikroskop 1a	Siemens
Eppendorf-Reagiergefässe	Sarstedt
Gefriertrocknung WKF Modell L2	Gesellschaft f. elektrophysikal. Apparatebau, Brandau/Odw.
Gewebekulturflaschen, 50 ml, steril	Greiner, Nürtingen
Gewebekulturflaschen, 650 ml, steril	Costar, Cambridge, MA, USA
Gewebekultur Cluster Platten, steril, 24 well, mit Deckel; Nr. 3524	Costar
Gewebekultur Cluster Platten, steril, 96 flat bottom wells, mit Deckel; Nr. 3596	Costar
Gewebekulturplatten Microtest II 96 flat bottom wells, + separatem Deckel, steril	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
Gradienten-Fraktionierung:	
Absorbance Monitor Modell UA-5	Instrumentation Specialities Company (ISCO), Lincoln, Nebraska
Density Gradient Fraktionator 185	Colora, Lorch
Fraction Collector 1200 PUP	Colora
Infrarot-Wärmestrahler "Theratherm"	Osram
Klimaschränke zur Pflanzenanzucht	Stiel, Tübingen
Küvetten aus Quarz, Typ MT4	
Mäusebluter	Biotec, Basel
Microtiterplatten, F-Form aus Immulon, Kobalt-sterilisiert M 129 B	Dynatech Microelisa Systems, Plochingen
Petrischalen, mit Nocken 92/15 mm, steril	Greiner

Petrischalen für Gewebekulturen, steril, TC-Qualität, mit Nocken, 35/10 mm	Greiner
Pipetten, serologisch, 5, 10 ml aus Polystyrol, steril	Falcon/Becton Dickinson
Polypropylen-Röhrchen, 2 ml, 12.5 x 38 mm, Schraubdeckel, steril	Greiner
Rollerkulturflaschen aus Duranglas, 670 cm^2, mit Schraubverschluss	Schott, Mainz
Refraktometer	Zeiss, Oberkochen
Säulenchromatographie:	
Schlauchpumpe STA 131900	Desaga, Heidelberg
Schlauchpumpe Ismatec mp-ge	Heinemann, Schwäb. Gmünd
Fraktionssammler Typ Ultrorak 7000	LKB, Gräfelfing
Detector Uvicord II, Typ 8303A	LKB
Fallbügelschreiber, Typ 6520A	LKB
Schüttelmaschine, Typ KS	Bühler, Tübingen
Siebchen zur Homogenisierung von Milzzellen: Ø 3 cm; Höhe 1.8 cm; Maschenweite 250 µm; Nr. 75 mesh; Drahtdicke 0.1 mm.	Universitätswerkstatt
Spectralphotometer:	
für Absorptionsmessungen: PMQ 3	Zeiss
für Absorptionsspektren: Uvikon 820 mit Recorder und Printer	Contron, Stuttgart
für ELISA: Titertek Multiskan	Flow Laboratories, Meckenheim
Sterile Werkbank	Meissner & Wurst, Stuttgart
Sterilfiltrationsgerät SM 16510 mit Entkeimungsschichten Nr. 1121, Ø 47 mm, 0.2 µm Porengrösse	Sartorius, Göttingen
Torf-Presslinge, Typ Jiffy-9	Schleicher & Schüll, Dassel
Umkehrmikroskope	Romberg, Hamburg
Waring Blendor	Leitz, Wetzlar und Zeiss, Oberkochen
Zählkammer nach Thoma, 0.1 mm Tiefe	Heinemann

Ultra-Turrax Homogenisator	Janke & Kunkel, Staufen
Zentrifugen:	
Christ-Minifuge	Heraeus, Hanau
Tischzentrifugen Modell 3200 u. 5412	Eppendorf, Hamburg
Sorvall Superspeed Zentrifugen Modelle RC-2B und RC-5B mit den Rotoren GSA und SS-34	Sorvall/Du Pont, Bad Nauheim
Ultrazentrifuge Modell L5-65 mit den Rotoren 60 Ti, 50 Ti, 45 Ti, und SW 40, SW 50, SW 27.	Beckman Instruments, USA
Zentrifugenröhrchen zum SW 40-Rotor aus Cellulosenitrat und Ultra-Clear	Beckman Instruments
Zentrifugenröhrchen aus Polystyrol 30 ml, 24/90 mm, Schraubverschluss, steril	Greiner

2. Methoden

2.1 VIRUSVERMEHRUNG

2.1.1 Tabak Mosaik Virus (TMV)

Die drei verwendeten TMV-Stämme, *vulgare* (TMV), *dahlemense* (TMV-*d*) und Holmes'Ribgrass (TMV-HR) wurden auf *Nicotiana tabacum* cv Samsun systemisch vermehrt. Dazu wurden die 2 untersten Blätter jeder Pflanze (4-5-Blatt-Stadium) mit Korund bestäubt und mit einem Glasspatel TMV-infizierter Pflanzensaft aufgebracht, der durch Homogenisierung von frischem oder bei -18°C gelagertem Blattmaterial mit 0.01 M Sörensen-Phosphatpuffer (SPP), pH 7.2 im Verhältnis 1:3 hergestellt wurde. Nach etwa 3 Wochen Inkubation der Pflanzen in Klimaschränken bei 4 000 lux, 22°C, 60-80% relativer Luftfeuchte und 16 h Licht/8 h Dunkel-Rhythmus wurden alle Blätter mit Mosaiksymptomen geerntet (10-20 g/Pflanze) und bei -18°C gelagert.

2.1.2 Arabis Mosaik Virus (ArMV)

ArMV wurde auf Gurken (*Cucumis sativus*), Typ MR 17, vermehrt. Dazu wurden die Kotyledonen von Gurkensämlingen etwa 2 Wochen nach der Aussaat infiziert. Frisches oder zuvor gefrorenes, ArMV-infiziertes Blattmaterial wurde mit 0.05 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0 (Waterworth, 1975) im Verhältnis 1:3 durch Mörsern homogenisiert und mit einem Pinsel auf die zuvor mit Korund bestäubten Kotyledonen aufgebracht.

Etwa 3 Wochen nach der Infektion wurden die Pflanzen geerntet und bei -18°C gelagert. Die Kotyledonen zeigten nekrotische Lokalläsionen, die oft deformierten Primärblätter eine gelb-grün Scheckung. Je nach der Aussaatdichte wurde eine Ausbeute von 600-800 g Blattmaterial/m² erzielt. Die Inkubation der Pflanzen erfolgte in Klimaschränken bei 5 000 lux, 18-20°C, 60-80% relativer Luftfeuchte und 16 h Licht/8 h Dunkel-Rhythmus.

2.1.3 Potato Leafroll Virus (PLRV)

PLRV wurde zur Vermehrung durch die grüne Pfirsichblattlaus (*Myzus persicae* Sulz.) auf *Physalis floridana* Rydg. übertragen. Hierzu war eine virusfreie Kultur von *M. persicae* von Chinakohl auf virusfreien *Physalis*-Pflanzen angelegt worden. Diese virusfreien Aphiden liess man 2-5 Tage auf PLRV-infizierten *P. floridana* zur Aufnahme des Virus saugen. Die besaugten Blätter mit den Läusen wurden abgeschnitten und auf dicht pikierte Sämlinge oder getopfte *P. floridana* aufgelegt, um die Aphiden abwandern und die gesunden Pflanzen infizieren zu lassen. Nach 1-2 Wochen wurden die Aphiden durch Begasung mit Nikotin abgetötet.

Der Infektionserfolg auf *P. floridana* wurde nach weiteren 4-5 Wochen mit dem ELISA (Tab. 2) überprüft. Dabei konnte in 208 von 213 Pflanzen (97.6%) PLRV nachgewiesen werden. Das Laub infizierter Pflanzen war leicht gelb gefärbt und leicht gescheckt.

Blattmaterial wurde entweder durch Zurückschneiden und Wiederaustreiben der infizierten Pflanzen gewonnen, oder durch Anziehen neuer Pflanzen aus Stecklingen. Um zügiges Wachstum zu gewährleisten, wurden regelmässig die Blüten entfernt und die Pflanzen 1x wöchentlich mit Mairol gedüngt. Jeden Monat konnten so 400-800 g Blätter und Stengel/m^2 (100 Pflanzen) geerntet werden. Stecklinge wurden mit Stim root R_2 (Bewurzelungsmittel) in Jiffy-Torfpresslingen bewurzelt, getopft und mit dem ELISA auf PLRV geprüft. Alle Stecklinge (135/135) bewurzelten, wuchsen an und waren PLRV-infiziert.

Pflanzen und Aphiden wurden in Klimaschränken bei 2 000 lux, 20-23°C, 60-80% relativer Luftfeuchte und 16 h Licht/8 h Dunkel-Rhythmus inkubiert.

2.2 VIRUSREINIGUNG

Die Reinigung aller Viren wurde bei 4°C durchgeführt. Die Lösungen, Puffer und Geräte wurden ebenfalls auf diese Temperatur gebracht. Alle Geräte, Behälter und Puffer waren, entweder durch Autoklavieren (20 min, 120°C), trockene Hitze (120 min, 180°C), oder UV-Bestrahlung (20 min, 254 nm Wellenlänge) sterilisiert worden. Das Virus-infizierte Pflanzenmaterial, gelagert bei -18°C, wurde über Nacht bei 4°C langsam aufgetaut, und mit einem Waring Blendor 1-2 min auf der höchsten Stufe homogenisiert.

Niedertourige Zentrifugationen wurden in einer Sorvall-Zentrifuge, hochtourige Zentrifugationen in einer Spinco-Beckman Ultrazentrifuge, Modell L5-65, durchgeführt.

2.2.1 Tabak Mosaik Virus (TMV)

Die Reinigung von TMV *vulgare* (Schema 1) wurde bereits ausführlich beschrieben (Dietzgen, 1981).

Die TMV-Stämme *dahlemense* und Holmes'Ribgrass wurden, wie in Schema 2 dargestellt, gereinigt: TMV-infizierte Tabakblätter wurden mit 0.5 M Sörensen-Phosphatpuffer (SPP) + 1% Mercaptoethanol, pH 7.2 homogenisiert (1 ml/g Blattmaterial) und durch Mull filtriert (Gooding & Hebert, 1967). Die Chloroplasten wurden durch Zugabe von n-Butanol (8 ml/100 ml Filtrat) und anschliessende niedertourige Zentrifugation (GSA-Rotor, 8 000 Upm, 30 min) entfernt. Die Virionen wurden mit Polyethylenglykol (PEG) 6 000 präzipitiert (4 g/100 ml Saft), durch niedertourige Zentrifugation (GSA-Rotor, 8 500 Upm, 15 min) sedimentiert, die Sedimente in 0.01 M SPP, pH 7.2 resuspendiert (20 ml/100 ml Rohsaft), und nicht suspendierbare Bestandteile sedimentiert (GSA-Rotor, 8 500 Upm, 15 min). Die Virionen wurden ein zweites Mal präzipitiert (0.4 g PEG 6 000 + 0.4 g NaCl/10 ml TMV-Suspension), sedimentiert (SS-34-Rotor, 10 000 Upm, 15 min), die Sedimente in 0.01 M SPP, pH 7.2 resuspendiert (2 ml/100 ml Rohsaft) und nicht suspendierte Bestandteile durch erneute Zentrifugation (SS-34-Rotor, 10 000 Upm, 15 min) entfernt.

Die weitere Reinigung der TMV-Suspension erfolgte durch zweimalige differentielle Zentrifugation (Ti 45-Rotor, 40 000 Upm, 180 min/SS-34-Rotor, 10 000 Upm, 15 min). Das Sediment der Ultrazentrifugation wurde in 0.01 M SPP, pH 7.2 resuspendiert. Die gereinigte TMV-Suspension wurde in zugeschmolzenen Ampullen bei -18°C gelagert.

TMV-Bruchstücke wurden durch CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation (33% (w/v) CsCl, SW 40-Rotor, 36 000 Upm, 45 h, 15°C) entfernt (Dietzgen, 1981).

2.2.2 Arabis Mosaik Virus (ArMV)

ArMV-infizierte Gurken wurden, entsprechend der von Harrison und Nixon (1960) beschriebenen, leicht veränderten, Methode (Schema 3), nach Zugabe von 0.2 M Na_2HPO_4, 0.1 M Ascorbinsäure und n-Butanol/Chloroform (1:1, v/v) homogenisiert (50 ml/50 ml/400 ml/100 g Blattmaterial). Grobe Pflanzenbestandteile, sowie Chloroplasten wurden durch Zentrifugation abgetrennt (GSA-Rotor, 8 000 Upm, 10 min). Aus dem gelb-grünen, klaren Überstand wurden die Virionen mit 10% PEG 6 000 + 0.2 M NaCl gefällt, sedimentiert (GSA-Rotor, 9 000 Upm, 15 min), in 0.033 M SPP, pH 7.5 resuspendiert, und nicht suspendierbare Bestandteile durch niedertourige Zentrifugation entfernt (GSA-Rotor, 8 000 Upm, 10 min). Durch zweimalige differentielle Zentrifugation (Ti 45-Rotor, 42 000 Upm, 120 min/SS-34-Rotor, 9 500 Upm, 10 min) wurden die Virionen angereichert. Die Sedimente der Ultrazentrifugationen wurden in 0.033 M SPP, pH 7.5 resuspendiert.

Zur weiteren Reinigung wurde eine Ultrazentrifugation in einem 5 - 30% (w/v) Sucrosegradienten (SW 40-Rotor, 30 000 Upm, 120 min) und/oder in einem 38.5% (w/v) gemischten CsCl-Dichtegradienten (SW 40-Rotor, 36 000 Upm, 45 h, 15°C) durchgeführt. Die ArMV-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, gegen 0.033 M SPP, pH 7.5 dialysiert, die Virionen durch Ultrazentrifugation sedimentiert, in wenig Puffer resuspendiert und nicht suspendiertes Material durch niedertourige Zentrifugation entfernt.

2.2.3 Potato Leafroll Virus (PLRV)

Die Reinigung von PLRV ist in Schema 4 im Oberblick dargestellt. Im einzelnen wurden PLRV-infizierte Blätter und Stiele von *Physalis floridana*, die mindestens 6 Wochen bei -18°C gelagert waren, aufgetaut und mit Homogenisierungspuffer (0.16 M CPP + 0.2% Thioglykolsäure, pH 6.0 homogenisiert (3 ml/g Pflanzenmaterial). Ein Prozent (w/v Homogenisierungspuffer) Driselase wurde, um Schäumen zu vermeiden, in wenig Homogenisierungspuffer suspendiert, nach der Homogenisierung zugegeben, und das Homogenat 120 min bei 28°C unter Schütteln (80 Upm) inkubiert (Gugerli, 1979; Takanami & Kubo, 1979).

Das Homogenat wurde durch Mull filtriert, das zurückbehaltene Fasermaterial mit Homogenisierungspuffer reextrahiert (1 ml/g ursprüngliches Pflanzenmaterial), filtriert, und die vereinigten Filtrate durch niedertourige Zentrifugation (GSA-Rotor, 6 000 Upm, 15 min) geklärt.

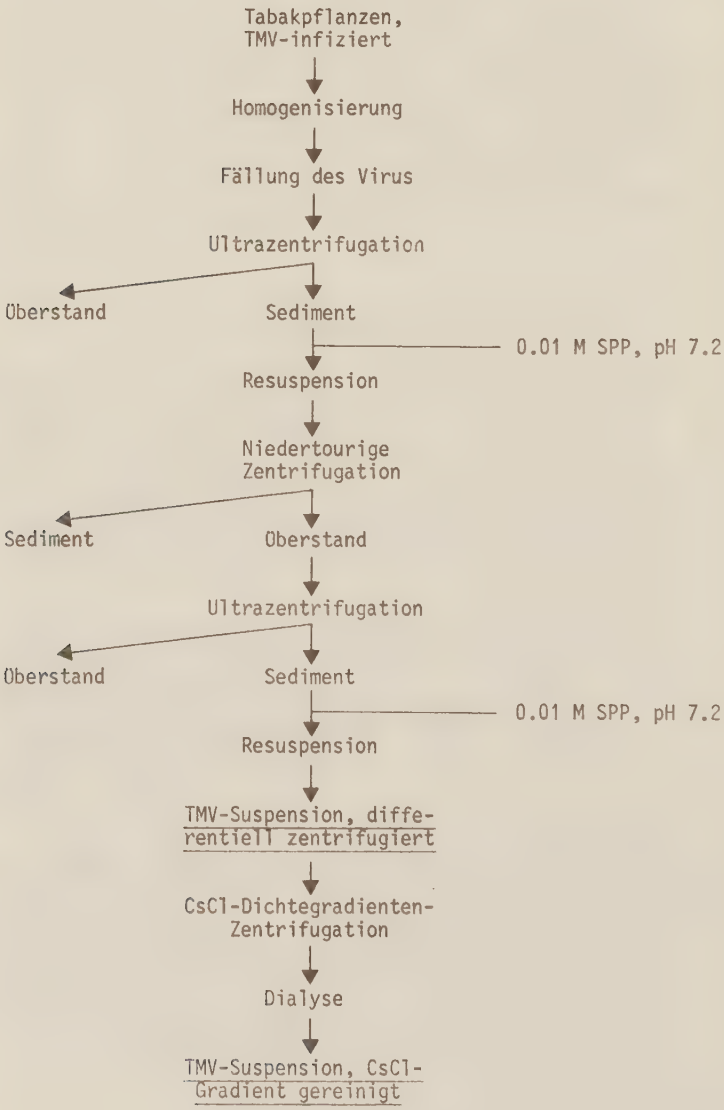
Die Virionen und einige Wirtskomponenten wurden durch Zugabe von 1 Volumen Polyethylenglykol-Lösung (40% PEG 6 000 + 0.4 M NaCl) zu 3 Volumen des Überstandes und 120 min Inkubation bei 4°C präzipitiert. Das Präzipitat wurde durch niedertourige Zentrifugation (GSA-Rotor, 6 000 Upm, 20 min) vollständig sedimentiert und die Sedimente in 0.045 M CPP + 0.2% Mercaptoethanol, pH 7.0 über Nacht resuspendiert (1.5 ml/g Pflanzenmaterial).

Zum Entfernen von grünen Pflanzenbestandteilen wurde die Virussuspension mit einem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (1:2, v/v, 4°C) versetzt, 10 min geschüttelt, niedertourig zentrifugiert (GSA-Rotor, 6 000 Upm, 20 min) und die obere, leicht gelbe, wässrige Phase gesammelt. Um noch vorhandene Chloroformreste zu entfernen, wurde die wässrige Phase unter Rühren mit Stickstoff begast, oder die Virionen durch Zugabe von 10% PEG 6 000 + 0.4 M NaCl präzipitiert, sedimentiert (GSA-Rotor, 6 000 Upm, 20 min) und in 0.045 M CPP + 0.2% Mercaptoethanol resuspendiert.

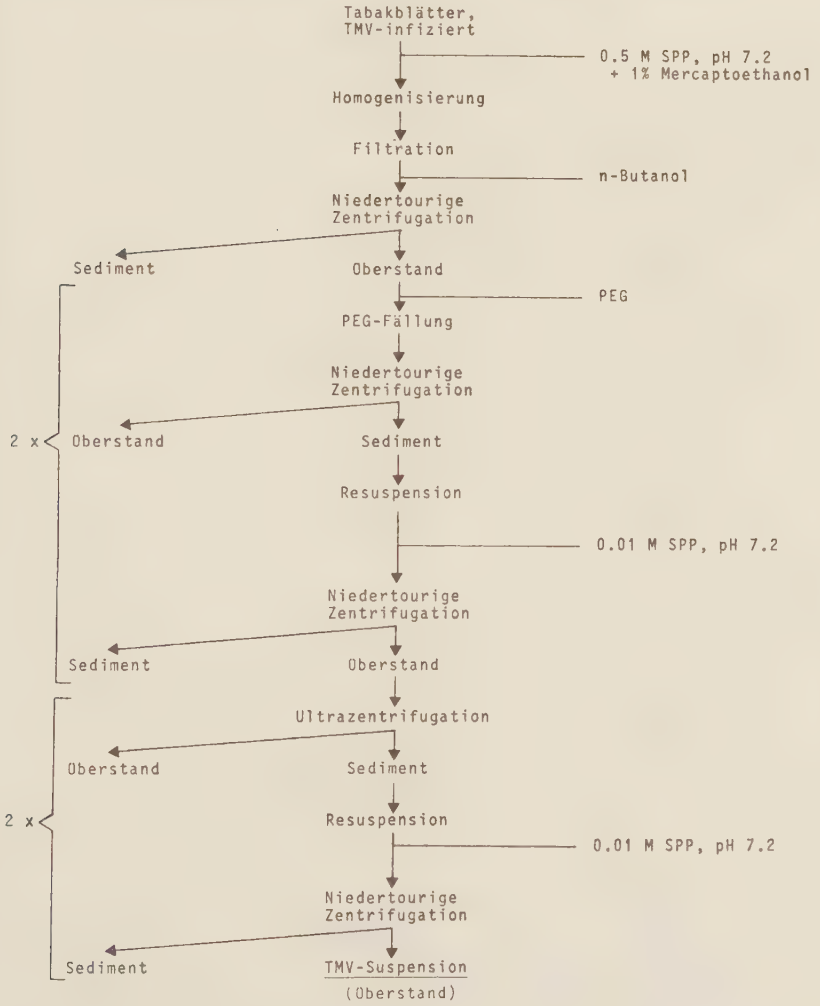
Die weitere Reinigung der Virussuspension erfolgte durch zweimalige differentielle Zentrifugation (Ti 45-Rotor, 38 000 Upm, 150 min/GSA-Rotor, 6 000 Upm, 20 min). Die Sedimente der Ultrazentrifugation wurden in 0.045 M CPP + 0.2% Mercaptoethanol, pH 7.0 (+ 1% Triton X-100; nur 1. Pellet) suspendiert.

Durch Ultrazentrifugation in einem diskontinuierlichen CsCl-Dichtegradienten aus gleichen Volumina 30, 35, 40, 45% CsCl (w/w) in 0.018 M CPP, pH 7.0 (SW 50-Rotor, 44 000 Upm, 300 min) und Dialyse der PLRV-haltigen Fraktionen gegen 0.018 M CPP, pH 7.0 wurde die PLRV-Reinigung abgeschlossen.

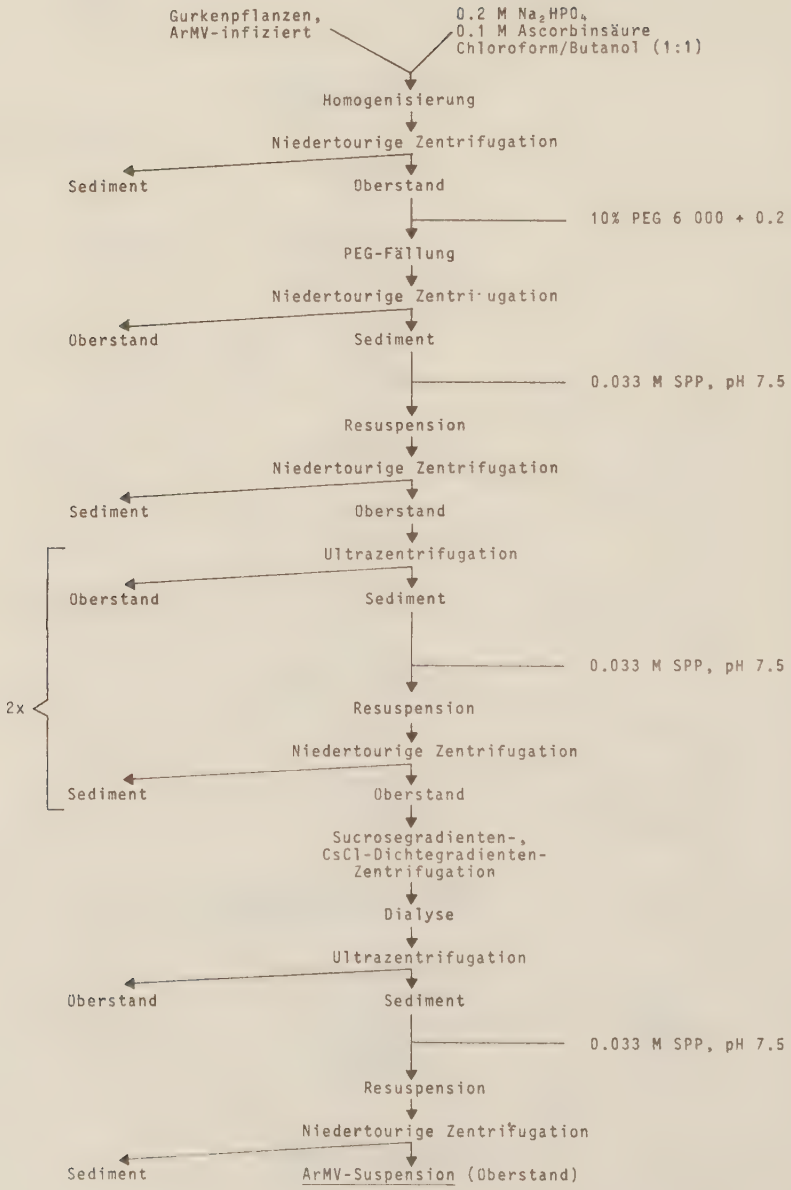
Schema 1: REINIGUNG VON T M V *VULGARE* (Dietzgen, 1981)



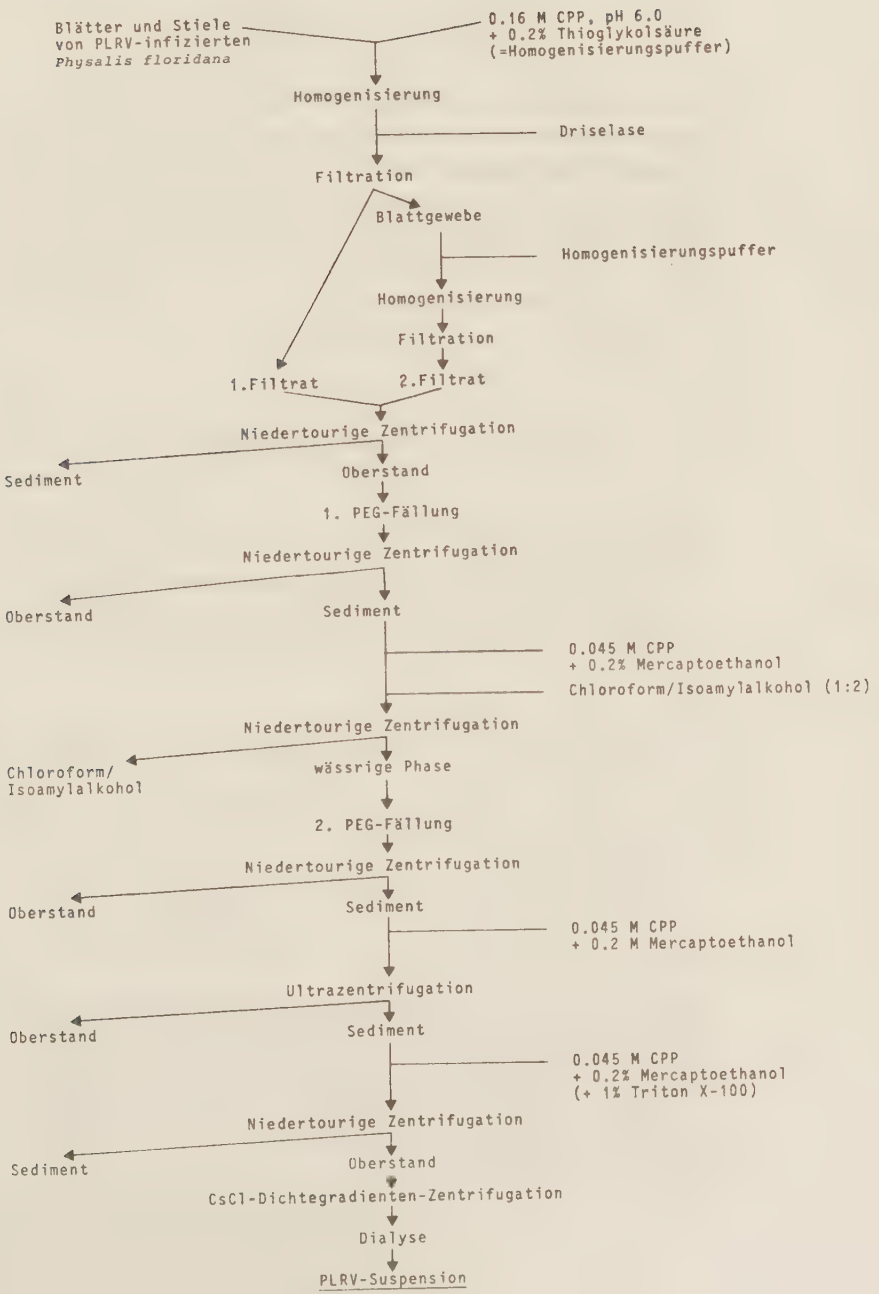
Schema 2: REINIGUNG DER T M V-STAMME *DAHLEMENSE* UND HOLMES' RIBGRASS



Schema 3: REINIGUNG VON A r M V



Schema 4: REINIGUNG VON P L R V



2.3 CHARAKTERISIERUNG DER GEREINIGTEN VIREN

2.3.1 Spektroskopische Untersuchungen

Virussuspensionen absorbieren aufgrund des Verhältnisses von Protein und Nukleinsäure im Viruspartikel UV-Licht auf charakteristische Art. Durch die Messung des UV-Absorptionsspektrums kann man daher Informationen über Reinheit und das charakteristische Verhältnis der Extinktionen bei 260nm und 280nm Wellenlänge erhalten, sowie anhand des Extinktionskoeffizienten die Viruskonzentration errechnen.

Die Extinktion der gereinigten Virussuspensionen wurde im Bereich von 240-320nm Wellenlänge mit dem jeweiligen Suspensionspuffer als Referenz aufgezeichnet. Die Proben wurden so verdünnt, dass die Extinktionswerte zwischen 0.2 und 0.8 lagen, da in diesem Bereich die Extinktion proportional der Konzentration ist (Noordam 1973). Die Extinktionskoeffizienten (1 cm Lichtweg, 25°C) der gereinigten Viren betragen:

für TMV : $Ext._{260nm}$ 2.7 = 1 mg/ml (Isco Tables, 1974)

für ArMV: $Ext._{260nm}$ 8.45 = 1 mg/ml (Waterworth, 1975)

für PLRV: $Ext._{260nm}$ 5.0; 8.6 = 1 mg/ml (Gugerli, 1979; Takanami & Kubo, 1979)

Aus dem Ext.-wert bei 260nm Wellenlänge wurde nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz die Konzentration der jeweiligen Virussuspension und durch Multiplikation mit dem Volumen die Gesamtmenge an Virus berechnet (vgl. Dietzgen, 1981).

2.3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Virusgehalt, Partikelform und -grösse, sowie Reinheit der Viren wurde im Elektronenmikroskop untersucht. Dazu wurden Proben der Virussuspensionen auf befilmte, mit Kohle bedampfte und beglimmte Trägernetzchen aufgetragen und mit Phosphowolframsäure (1%, pH 7.2) oder Uranylacetat (1%, pH 4.0) negativ kontrastiert (Nermut, 1973).

2.4 ISOLIERUNG DES VIRALEN HÜLLPROTEINS

2.4.1 TMV-Protein (TMVP)

Zur Prüfung ob nach der Immunisierung von Mäusen mit intakten TMV-Virionen und Fusion immunkompetenter Milzzellen mit Myelomzellen auch Hybridomas entstehen, die monoklonale Antikörper (MCA) sekretieren, welche gegen solche antigenen Determinanten des TMV-Hüllproteins gerichtet sind, die beim intakten Viruspartikel nicht zugänglich sind (Cryptotope), wurde das Hüllprotein der TMV-Stämme isoliert und so suspendiert, dass ausschliesslich Proteinmonomeren vorlagen (van Regenmortel & Lelarge, 1973). Zum Nachweis solcher MCA wurden diese Monomere im ELISA eingesetzt.

Die Isolierung erfolgte bei allen 3 TMV-Stämmen, *vulgare*, *dahlemense* und Holmes'Ribgrass, nach der Methode von Fraenkel-Conrat (1957), wonach hochgereinigtes TMV mit 67% Eisessig versetzt und die präzipitierte RNA durch Zentrifugation entfernt wurde. Der 1:1 mit H_2O bidest. verdünnte Überstand wurde danach gegen H_2O bidest. dialysiert, bis das Protein bei Erreichen des isoelektrischen Punktes in weissen Flocken aggregierte.

Es wurde durch anschliessende Ultrazentrifugation sedimentiert, in H_2O bidest. resuspendiert, der pH-Wert auf 8.0 eingestellt, so dass die Suspension klar wurde und bei -18°C gelagert.

Zur Charakterisierung des isolierten TMV-Proteins wurde das Absorptionsspektrum im Bereich von 240-320 nm Wellenlänge aufgezeichnet und daraus das Verhältnis von Absorptionsmaximum zum -minimum, sowie die Konzentration berechnet ($Ext._{280nm}$ 1.27 = 1 mg TMV-Protein/ml; Noordam, 1973). Die quantitative Aminosäurezusammensetzung des jeweils isolierten Hüllproteins wurde mit einem automatischen Aminosäure-Analysator überprüft.

2.4.2 Tryptische Peptide des Hüllproteins von TMV

Die vollständige Aminosäuresequenz des Hüllproteins von TMV (TMVP) ist bekannt (Anderer *et al.*, 1965; van Regenmortel, 1981). Es enthält 158 Aminosäuren je Proteinmonomer.

Mit Hilfe gereinigter, in ihrer Sequenz bekannter Peptide von TMVP (Anderer & Handschuh, 1962), kann die genaue Spezifität von monoklonalen Antikörpern gegen TMV im ELISA bestimmt werden. Es ist dann möglich festzustellen, welchen Bereich des viralen Hüllproteins die einzelnen monoklonalen Antikörper erkennen, d.h. gegen welche antigene Determinante sie gerichtet sind.

Die verwendete Nomenklatur der tryptischen Peptide von TMVP entspricht der von Tsugita *et al.* (1960) vorgeschlagenen.

2.4.2.1 Herstellung und Reinigung tryptischer Peptide

Eine TMVP-Suspension (5 mg/ml H_2O bidest.) wurde mit 1% Trypsin (w/v) 120 min bei 37°C unter leichtem Rühren inkubiert und dabei pH 7.8 mit 0.1% NH_4OH konstant gehalten (Altschuh & van Regenmortel, 1982). Durch Absenken des pH-Wertes auf 4.6 mit 1N Essigsäure wurde die Reaktion gestoppt. Das dabei entstandene Präzipitat wurde sedimentiert (Christ-Minifuge, 5 000 Upm, 20 min), vom Oberstand getrennt und durch 4-malige isoelektrische Präzipitation bei pH 4.6 (Funatsu *et al.*, 1964) gereinigt.

Das Präzipitat besteht aus dem in saurem pH unlöslichen tryptischen Peptid 1 (Aminosäurereste 1-41), welches mit 60-70% des tryptischen Peptids 10 (Aminosäurereste 123-134), welches auch in den löslichen Peptiden vorkommt, verunreinigt ist (Stepanov *et al.*, 1961; Funatsu *et al.*, 1964).

Zur Trennung der tryptischen Peptide 1 und 10 wurden die in Essigsäure präzipitierten Peptide zuerst gegen 0.01 M Sörensen-Phosphatpuffer (SPP), pH 7.2 dialysiert und durch Ultrafiltration eingeengt. Eine konzentrierte Suspension der Peptide in 8 M Harnstoff wurde auf eine mit 0.01 M NaOH äquilibrierte Sephadex G 50-Säule (3.5 x 135 cm) aufgetragen und bei gleichzeitiger Aufzeichnung der Extinktion bei 280 nm Wellenlänge mit 0.01 M NaOH eluiert. Die Fraktionen der tryptischen Peptide 1 und 10 wurden jeweils vereinigt, gegen 0.01 M SPP, pH 7.2 dialysiert und durch Ultrafiltration konzentriert. Die Konzentration der Peptide wurde spektrophotometrisch und die Reaktivität mit Antikörpern gegen TMV in einem direkten ELISA (Tab. 3) ermittelt.

Die im Oberstand des tryptischen Verdaus suspendierten "löslichen Peptide" wurden über Nacht bei 4°C gehalten, erneut auf pH 4.6 eingestellt und das dabei entstandene geringe Präzipitat sedimentiert. Der Oberstand wurde gegen H_2O bidest. dialysiert und die löslichen tryptischen Peptide lyophilisiert. Nach Resuspension in 10% Essigsäure wurden nicht suspendierbare Bestandteile sedimentiert (Christ-Minifuge, 5 000 Upm, 5 min).

Die saubere Auftrennung der löslichen tryptischen Peptide in präparativem Masstab wurde bisher noch nicht zufriedenstellend erreicht, so dass Bindungsexperimente der monoklonalen Antikörper mit den isolierten löslichen tryptischen Peptiden von TMVP noch ausstehen.

Versuche zur Trennung der Peptide mittels Hochspannungspapierelektrophorese (Milton & van Regenmortel, 1979) und Chromatographie auf Dünnschicht-Celluloseplatten (Altschuh & van Regenmortel, 1982) führten nicht zu reinen Peptiden in genügender Menge. In Vorversuchen wurde die präparative Peptidtrennung durch eine High Performance Liquid Chromatography (HPLC) erprobt, wobei eine erste Trennung der Peptide durch Gelfiltration und anschliessende Ionenaustausch-Chromatographie der erhaltenen Peaks gute Ansätze zeigte und sich nach Optimierung der Parameter der HPLC als derzeit beste und empfindlichste Trennungsmethode für die löslichen tryptischen Peptide von TMVP anbieten würde.

2.4.2.2 Synthese und Kopplung des C-terminalen Tetrapeptids von TMV-Protein

Das C-terminale Tetrapeptid H_2N-Gly-Pro-Ala-Thr-OH des Hüllproteins von TMV *vulgare* wurde freundlicherweise von J. Christner (Institut für Organische Chemie, Universität Tübingen) nach den konventionellen Methoden mit intermediärer Z-(Benzyloxycarbonyl-) Schutzgruppe und temporärem Schutz auf Tertiärbutylether- bzw. Tertiärbutylester-Basis synthetisiert. Das Peptid wurde mittels eines cross-linkers über eine Azid-Kupplung an Humanserumalbumin (HSA) (MG = 66 000) bzw. Polylysin (MG = 80 000) als polymere Träger gebunden. Die Reinheit wurde durch Aminosäureanalyse, Elementaranalyse, Dünnschichtchromatographie, ^{13}C-NMR-Spektroskopie, sowie einem D-, L-Test gaschromatographisch auf Chirasil-Val (G. Nickolson, Institut für Organische Chemie, Universität Tübingen), überprüft.

Die C-terminale Aminosäure Threonin, das synthetisierte Tetrapeptid (STP) mit und ohne cross-linker, sowie die an HSA bzw. Polylysin gekoppelten Peptidreste (unterschiedliche Zahl von gekoppelten Peptiden/Trägermolekül) wurden in einem direkten double antibody sandwich ELISA (Schema 5; Tab. 3a) und einem indirekten ELISA (Tab. 3b) auf ihre antigene Reaktivität mit Antikörpern aus Kaninchen-Antiserum gegen TMV überprüft. Die antigen reaktiven Substanzen wurden dann zum Screening von monoklonalen Antikörpern (Tab. 11), die gegen diesen C-terminalen Bereich des TMV-Proteins gerichtet sind, verwendet.

Von den 58 in HSA vorhandenen Lysinresten sind für eine Kopplung nur 16-18 zugänglich, von denen 8 bzw. 16 mit je einem Tetrapeptid substituiert wurden (HSA-STP_8, HSA-STP_{16}). Bei Polylysin (PL) wurden alle frei zugänglichen (350), sowie 19.4% (68) der Lysinreste mit je einem Tetrapeptid substituiert (PL-STP_{350}, PL-STP_{68}).

2.4.3 ArMV-Protein (ArMVP)

Analog zu den Untersuchungen mit den Hüllproteinen der TMV-Stämme, wurde zur Auffindung von antigenen Determinanten, die im intakten Viruspartikel nicht zugänglich sind, das Hüllprotein des ArMV-Stammes ATCC (ArMVP) isoliert und die Reaktivität mit monoklonalen Antikörpern gegen ArMV bestimmt.

ArMVP wurde nach der von Chu & Francki (1979) für Tobacco Ringspot Virus, ein anderes Nepovirus, beschriebenen Methode, hergestellt. Durch CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigtes ArMV wurde durch Erhitzen (2 h, 55-60°C) in 0.1 M SPP, pH 8.0 dissoziiert. Das präzipitierte Protein wurde sedimentiert (Sorvall, SS-34-Rotor, 6 500 Upm, 15 min) und mehrfach mit H_2O dest. gewaschen. ArMVP wurde in 0.01 M SPP, pH 7.2 + 1% Tween 20 suspendiert, und in einer Konzentration von 10 µg/ml im ELISA zur Bestimmung der Spezifität der monoklonalen Antikörper gegen ArMV (Tab. 12) verwendet.

2.5 IMMUNISIERUNG VON MÄUSEN

Um für die Zellfusion aktivierte B-Lymphozyten zu erhalten, die spezifische Antikörper gegen das jeweilige Pflanzenvirus produzieren, wurden 3 Monate alte weibliche Mäuse des STU-Inzuchtstammes (Schäfer, 1979) mit den durch Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigten Viren immunisiert.

Für die Immunisierung wurde gefriergetrocknetes TMV in 0.85% Saline suspendiert; ArMV und PLRV, 1:1 in Glycerin bei -18°C gelagert, wurden durch Ultrazentrifugation sedimentiert (2.2) und in 0.033 M Sörensen-Phosphatpuffer, pH 7.5 bzw. 0.018 M McIlvaine-Citrat-Phosphatpuffer, pH 7.2 resuspendiert. Zur 1. Immunisierung wurde die Virussuspension 1:1 mit komplettem Freund'schen Adjuvans emulgiert und jeweils 0.1 ml in jede Flanke subcutan injiziert (Dietzgen, 1981). In Abhängigkeit von Virus, injizierter Antigenmenge und Antikörpertiter im Serum schlossen sich eine bis drei weitere subcutane Immunisierungen an, wobei zur Emulgation inkomplettes Adjuvans verwendet wurde. Die letzte Immunisierung erfolgte mit 0.05 ml Virussuspension ohne Adjuvans intravenös in die Schwanzvene, 3-4 Tage vor Entnahme der Milz zur Zellfusion.

Die Zeitabstände zwischen den einzelnen Immunisierungen und die dabei injizierten Virusmengen pro Maus sind in Tabelle 1b angegeben. Die Impfschemata von PLRV und ArMV orientieren sich am Impfplan von TMV, der zu hohen Antikörper-Titern führte (Dietzgen, 1981).

Tabelle 1b: Immunisierung von Mäusen mit Pflanzenviren

Viren	Subcutane Immunisierung				Intravenöse Immunisierung	
	Zeitabstand[1] (Wochen)			Virus/Maus[2] (µg)	Zeitabstand[1] (Wochen)	Virus/Maus[2] (µg)
TMV	5-6	(3)	-	1500 - 2500	2-4	200
PLRV	5	-	-	80 - 150	2	40 - 130
ArMV	5	1-2	2-5	20 - 100	3	100

[1] Zeit nach der jeweils vorherigen Immunisierung

[2] Injizierte Virusmenge pro Immunisierung und Maus

Der Verlauf des virusspezifischen Antikörper-Titers im Serum der immunisierten Mäuse wurde mit dem ELISA verfolgt, um die Maus mit dem höchsten Titer für die Zellfusion zu erhalten.

2.6 MONOSPEZIFISCHE ANTIKÖRPER GEGEN T M V

Zur Bestimmung der Nachweisbarkeitsgrenze von Antikörpern gegen TMV und der Schätzung der Konzentration monoklonaler Antikörper in Kulturüberständen, in den verschiedenen ELISA-Testsystemen (Tab. 9, 11), wurden monospezifische Antikörper gegen TMV isoliert.

Dazu wurde zuerst die γ-Globulinfraktion des Serums eines mit TMV hyperimmunisierten Kaninchens durch Fällung mit Ammoniumsulfat und anschliessende Säulenchromatographie an Sepharose-6B gereinigt (Dietzgen, 1981; Mishell & Shiigi, 1980).
Daraus wurden, entsprechend der Technik von Hardie & van Regenmortel (1977), die monospezifischen Antikörper isoliert. Die Methode beinhaltet die Absorption von spezifischen Antikörpern durch TMV im Überschuss, Sedimentation des Virus mit den gebundenen Antikörpern durch Ultrazentrifugation (Ti-60 Rotor, 45 000 Upm, 60 min) und Entfernen von nicht TMV-spezifischen Antikörpern durch Verwerfen des Überstandes. Die gebundenen spezifischen Antikörper wurden bei pH 2.8 von TMV dissoziiert, das Virus durch erneute Ultrazentrifugation sedimentiert und der Überstand mit den dissoziierten spezifischen Antikörpern dekantiert und sofort mit NaOH neutralisiert.

Die Konzentration an monospezifischen Antikörpern gegen TMV wurde anhand der Extinktion bei 280nm und dem Extinktionskoeffizienten $Ext._{280nm}$ 1.4 = 1 mg Ak/ml (Schreier *et al.*, 1980) berechnet.

2.7 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Wegen der vielseitigen Variationsmöglichkeiten, der hohen Sensitivität und der schnellen Durchführbarkeit wurde der ELISA als Bindungstest zum Nachweis von Antigenen und Antikörpern verwendet.

Die zur Beschichtung der Mikrotiterplatten (Coating) verwendeten Proteine wurden in Coating Puffer (CP), pH 9.6 verdünnt. Die jeweiligen Proben wurden in Phosphat-gepufferter Saline + 0.05% Tween 20 (PBS-Tween) + 2% Polyvinylpyrrolidon (PVP), pH 6.0 (= Probenpuffer), die Enzym-markierten Antikörper (EMA) mit PBS-Tween + 2% PVP + 0.2% Rinderserumalbumin (RSA), pH 7.4 verdünnt. Enzymkonjugate wurden durch Kopplung von Antikörpern mit alkalischer Phosphatase im Verhältnis 1:2.5 (w/w) unter Verwendung von 0.06% Glutaraldehyd hergestellt (Clark & Adams, 1977). Als Substrat wurde p-Nitrophenylphosphat in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Mikrotiterplatten 3 mal durch Überfluten der Näpfe mit PBS-Tween gewaschen. Zwischen den Waschvorgängen wurden die Platten jeweils 5 min mit dem Puffer gefüllt bei 20-22°C inkubiert. Um die Platten abschliessend zu leeren, wurden sie 4-5 mal umgekehrt auf einem Tuch aufgeschlagen.

Alle ELISA-Varianten wurden in ihren Testparametern optimiert, um höchste Testempfindlichkeit bei geringstem Materialaufwand und unter Vermeidung nicht-spezifischer Reaktionen zu erhalten.

Zur Beurteilung der Testergebnisse wurde die Intensität der aufgetretenen Gelbfärbung anhand der Extinktion bei 405 nm Wellenlänge mit dem automatischen Titertek Multiskan ELISA-reader gemessen. Dabei wurde die Enzymreaktion zuvor nicht durch Zugabe von NaOH gestoppt, um die gleichen Proben nach verschiedenen Inkubationszeiten messen zu können. Dies ermöglicht die Bestimmung der spezifischen Aktivität von Antigen (Ag) oder Antikörper (Ak) im ELISA, d.h. die Zunahme der Extinktion in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer und Ag- bzw. Ak-Menge.

Die äusserste Reihe auf jeder Mikrotiterplatte (96 Näpfe, Immulon, Dynatech Microelisa Systems) wurde freigelassen, um unspezifische Randeffekte zu vermeiden. Die 8 Näpfe der Reihe 2 auf jeder Platte wurden aus messtechnischen Gründen nur mit Probenpuffer oder unbeimpftem Kulturmedium gefüllt (Negativkontrolle) und als Nullwerte bei der Extinktionsmessung eingestellt. Die verwendeten Positivkontrollen und weitere Negativkontrollen wurden bei den entsprechenden Tests beschrieben.

Zur schematischen Darstellung der nachfolgend aufgeführten ELISA-Varianten wurden folgende Zeichen verwendet:

virales Antigen

virales Antigen, ar die Mikrotiter-platte adsorbiert

spezifischer Antikörper, an die Mikrotiterplatte adsorbiert

spezifischer Antikörper

Enzym-markiertes Antiglobulin (EMA)

Enzym-markierter spezifischer Antikörper (EMA)

Antiglobulin = Antikörper gegen γ-Globuline einer anderen Tierspezies

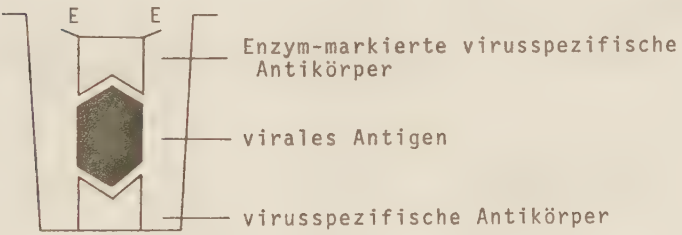
→ = gerichtet gegen spezifisches Antigen

Für den jeweils nachzuweisenden Testparameter wurden ausgefüllte Zeichen verwendet.

2.7.1 ELISA zum Nachweis von viralen Antigenen

Zum Nachweis viraler Antigene wurde der direkte double antibody sandwich ELISA verwendet (Schema 5).

Schema 5: ELISA zum Nachweis von viralen Antigenen



2.7.1.1 Nachweis von PLRV in infizierten *Physalis floridana*

Mit diesem Test wurde die erfolgreiche Übertragung von PLRV auf *Physalis floridana* durch Virus-infizierte *Myzus persicae* überprüft, um ausschliesslich PLRV-infizierte Pflanzen zu vermehren.

Als Negativkontrolle wurde gesunder *Physalis*-Saft und als Positivkontrolle gereinigtes PLRV (1 µg/ml) verwendet. Die Blattproben von *P. floridana* wurden 1:10 (w/v) mit Probenpuffer verdünnt, mit einem Ultra-Turrax homogenisiert und grobe Bestandteile sedimentiert (Christ-Minifuge, 5 000 Upm, 5 min). Jede Probe wurde in 3 Wiederholungen getestet. Eine deutliche Unterscheidung von positiven und negativen Proben war möglich, wenn eine $Ext._{405nm} > 0.05$ als Grenzwert nach 4 h Substratinkubation bei 37°C gewählt wurde.

Die Proben zeigten Extinktionswerte zwischen 0.05 und 1.2 optischen Einheiten.

Tabelle 2: Parameter des ELISA zum Nachweis von PLRV

Testschritt	Konzentration/ Verdünnung	Volumen/ Napf (µl)	Inkubation Zeit(h)	Inkubation Temp.(°C)
Coating: Ak→PLRV (v. Kaninchen)	1 µg/ml	200	3	37
Blattproben	1:10	200	16	4
EMA→PLRV (v. Kaninchen)	1:1 000	200	4	37
Substrat	1 mg/ml	300	4	37

2.7.1.2 Nachweis antigener Determinanten auf Peptiden von TMV-Protein (TMVP)

Zur Bestimmung antigener Determinanten in Peptiden von TMVP wurde mit dem ELISA festgestellt, welche der durch Verdau von TMVP hergestellten oder chemisch synthetisierten Peptide mit Antikörpern gegen TMV (vom Kaninchen) reagieren. Die positiv reagierenden Peptide wurden dann zur Bestimmung der genauen Spezifität monoklonaler, gegen TMVP gerichteter Antikörper herangezogen (Tab. 11). Als Positivkontrollen wurden TMV, TMVP, sowie eine Mischung der löslichen Peptide von TMVP (2.4.2.1) verwendet.

Tabelle 3: Parameter des ELISA zum Nachweis von antigenreaktiven Peptiden von TMV-Protein

(a) Double antibody sandwich ELISA (Schema 5):

Testschritt	Konzentration/ Verdünnung	Volumen/ Napf (µl)	Inkubation Zeit(h)	Inkubation Temp.(°C)
Coating: AK→TMV (v. Kaninchen)	1 µg/ml	200	3	37
Probe: Peptide von TMVP	10^{-4}-10^{-7} g/ml	200	16	4
EMA→TMV (v. Kaninchen)	1 : 500	200	4	37
Substrat	1 mg/ml	300	1	37

(b) Indirekter ELISA (vergl. Schema 6A):

Testschritt	Konzentration/ Verdünnung	Volumen/ Napf (µl)	Inkubation Zeit (h)	Inkubation Temp.(°C)
Coating: Peptide von TMVP	10^{-4}-10^{-9} g/ml	200	3	37
Ak→TMV (v. Kaninchen)	10 µg/ml	200	16	4
EMA→Kaninchen-IgG	1 : 500	200	4	37
Substrat	1 mg/ml	300	1	37

2.7.1.3 Nachweis von TMV mit poly- und monoklonalen Antikörpern

Mit diesem Test wurde die Nachweisbarkeitsgrenze von TMV mit polyklonalen und monoklonalen Antikörpern im ELISA bestimmt, wobei ein Grenzwert von 0.1 $Ext._{405nm}$ angenommen wurde.

Tabelle 4: Parameter des ELISA zum Nachweis von TMV

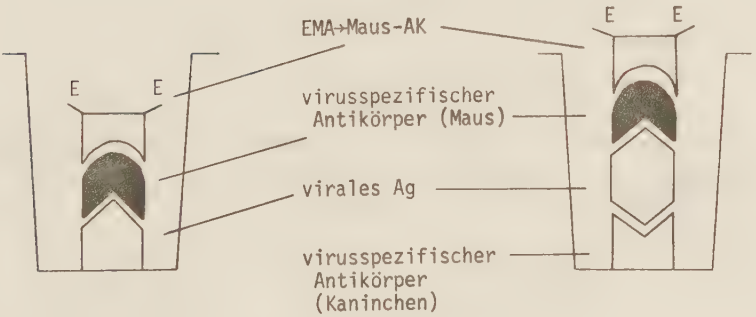
Testschritt	Konzentration/ Verdünnung	Volumen/ Napf (µl)	Inkubation Zeit(h)	Inkubation Temp.(°C
Coating: AK→TMV	0.1-10 µg/ml	200	3	37
Probe: TMV	Verdünnungsreihe	200	16	4
EMA→TMV	1:500	200	4	37
Substrat	1 mg/ml	300	1	37

2.7.2 ELISA zum Nachweis von virusspezifischen Antikörpern

Der Antikörpernachweis wurde mit der indirekten ELISA-Methode durchgeführt (Engvall & Perlmann, 1972; Voller *et al.*, 1976). Dabei wurden die Viruspartikeln zur Bindung der nachzuweisenden virusspezifischen Antikörper (von der Maus) entweder passiv an die Plastikoberfläche der Mikrotiterplatten adsorbiert (Schema 6,A) oder serologisch durch zuvor adsorbierte virusspezifische Antikörper einer anderen Tierspezies gebunden (Schema 6,B).

Wenn keine gereinigte Viruspräparation zum Beschichten der Testplatten zur Verfügung stand, wurden die Mikrotiterplatten mit virusspezifischen Antikörpern (vom Kaninchen) vorbeschichtet, die die Viruspartikeln spezifisch aus Virus-infiziertem Pflanzensaft "herausfischen" (Koenig, 1981). Dies ist notwendig, da die Adsorption von Viruspartikeln an die Oberfläche von ELISA-Platten durch rohen Pflanzensaft stark gehemmt wird und unspezifische Reaktionen im ELISA zur Folge hat.

Schema 6: ELISA zum Nachweis von virusspezifischen Antikörpern ohne (A), und mit (B), Antikörpervorbeschichteten Mikrotiterplatten



(A) (B)

Beim Beschichten der Testplatten mit ikosaedrischen Viren (PLRV, ArMV), sowie beim Nachweis von Hybridoma-Antikörpern, wurden nach Bindung der viralen Antigene, die an der Plastikoberfläche nicht besetzten, passiven Adsorptionsstellen durch Zugabe von 1% RSA/Saline blockiert (Kearney *et al.*, 1979).

2.7.2.1 Nachweis von Antikörpern im Serum

Die Häufigkeit mit der Antikörper-produzierende Hybridomas erhalten werden ist direkt korreliert mit dem Anteil Antikörper-produzierender Zellen in der Milz (Chan & Mitchison, 1982). Um für die Zellfusion jeweils die Maus mit der stärksten Immunantwort auswählen zu können, musste der virusspezifische Ak-Titer im Serum immunisierter STU-Mäuse mit dem ELISA bestimmt werden.

Die Tabellen 5-8 zeigen die ELISA-Parameter zum Nachweis von Antikörpern gegen TMV, ArMV und PLRV im Serum von Mäusen. Als Negativkontrolle wurden der ELISA-Probenpuffer, sowie Normalserum, d.h. Serum von nicht immunisierten STU-Mäusen, in den gleichen Verdünnungen, wie die untersuchten Antiseren, verwendet. Bei Verdünnungen >1:500 zeigte das Normalserum im ELISA keine Reaktion mehr. Virusspezifische Antikörper enthaltendes Mäuse-Antiserum diente als Positivkontrolle. Zur Bestimmung des Antikörpertiters im Serum, d.h. derjenigen Serumverdünnung, bei der im ELISA noch eine positive Reaktion erkennbar war, wurde als Grenzwert eine $Ext._{405nm} = 0.1$ gewählt.

Tabelle 5: Parameter des ELISA zum Nachweis von TMV-Antikörpern im Serum von STU-Mäusen

Testschritt	Konzentration/ Verdünnung	Volumen/ Napf (µl)	Inkubation Zeit	Inkubation Temp.(°C)
Coating: TMV	1 µg/ml	200	3h	37
Mäuse-Antiserum	Verdünnungsreihe	200	16h	4
EMA→Maus-Antikörper	1:1 000	200	4h	37
Substrat	1 mg/ml	300	45 min	37

Tabelle 6: Parameter des ELISA zum Nachweis von ArMV-Antikörpern im Serum von STU-Mäusen

Testschritt	Konzentration/ Verdünnung	Volumen/ Napf (µl)	Inkubation Zeit(h)	Inkubation Temp.(°C)
Coating: ArMV	5 µg/ml	200	3	37
Blockierung: RSA/ Saline	1%	300	1	20
Mäuse-Antiserum	Verdünnungsreihe	200	16	4
EMA→Maus-Antikörper	1:500	200	4	37
Substrat	1 mg/ml	300	2	37

Tabelle 7: Parameter des ELISA zum Nachweis von PLRV-Antikörpern im Serum von STU-Mäusen

Testschritt	Konzentration/ Verdünnung	Volumen/ Napf (µl)	Inkubation Zeit(h)	Inkubation Temp.(°C)
Coating: PLRV	1 µg/ml	200	4	37
Blockierung: RSA/ Saline	1%	300	1	20
Mäuse-Antiserum	Verdünnungsreihe	200	16	4
EMA→Maus-Antikörper	1:500	200	4	37
Substrat	1 mg/ml	300	4	37

PLRV ist nur in geringen Konzentrationen in den Wirtspflanzen vorhanden und durch seine Lokalisierung im Phloem schwierig in grösseren Mengen zu isolieren (Rowhani & Stace-Smith, 1979). Nach der Optimierung des Testsystems mit gereinigtem PLRV (Tab. 7) wurden die Virionen für den ELISA zum Nachweis von PLRV-Antikörpern durch Vorbeschichtung der Testplatten mit virusspezifischen Antikörpern aus PLRV-infiziertem Pflanzensaft serologisch gebunden, um gereinigtes PLRV zu sparen.

Tabelle 8: Parameter des ELISA zum Nachweis von PLRV-Antikörpern im Serum von STU-Mäusen mit Antikörpervorbeschichteten Platten

Testschritt	Konzentration/ Verdünnung	Volumen/ Napf (µl)	Inkubation Zeit(h)	Inkubation Temp.(°C)
Coating: Antiserum →PLRV (v.Kaninchen)	1:1 000	200	3	37
PLRV-infizierter Saft v. *Physalis floridana*	1: 10	200	2	37
Blockierung: RSA/ Saline	1%	300	1	20
Mäuse-Antiserum	Verdünnungsreihe	200	16	4
EMA→Maus-Antikörper	1: 500	200	4	37
Substrat	1 mg/ml	300	1	37

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten wurde aus einer grösseren Menge PLRV-infizierter *Physalis*-Pflanzen durch Homogenisierung 1:10 mit Probenpuffer, Saft hergestellt, wie er für dieses ELISA-System notwendig war und in Portionen bei -18°C gelagert. Die durch den Vergleich der Reaktivität einer Verdünnungsreihe von diesem PLRV-infizierten Saft und gereinigtem PLRV bekannter Konzentration im ELISA (Tab. 8) bestimmte Konzentration betrug 3 µg PLRV/ml.

Das neue Testsystem (Tab. 8) zeichnete sich durch erhöhte Empfindlichkeit aus, da schon nach 1 h Inkubation mit Substrat (statt 4 h) gleich hohe Antikörpertiter festgestellt werden konnten, die sich bei längerer Inkubation noch steigerten.

2.7.2.2 Nachweis von Antikörpern in Hybridoma-Kulturüberständen

Zur Selektion von virusspezifische-Antikörper-produzierenden Hybridomas (somatischen Zellhybriden) nach der Zellfusion und nach den Klonierungen, sowie zur Überprüfung fortlaufender Antikörperproduktion wachsender Hybridoma-Klone, wurden sekretierte virusspezifische Antikörper in den Kulturüberständen mit dem schnellen und empfindlichen ELISA aufgefunden (Tab. 9, 10).

Tabelle 9: Parameter des ELISA zum Nachweis von Antikörpern (Ak) gegen TMV, TMV-Protein (TMVP), sowie ArMV in Hybridoma-Kulturüberständen

Testschritte		Konzentration/ Verdünnung	Volumen/ Napf (µl)	Inkubation Zeit(h)	Inkubation Temp.(°C)
	TMV	50, 10, 1.0 µg/ml			
Coating:	TMVP	50, 10 µg/ml	200	3	37
	ArMV	5 µg/ml			
Blockierung: RSA/ Saline		1%	300	1	20
Kulturüberstände mit virusspezifischen Maus-Ak		unverdünnt	200	3	37
EMA→Maus-Ak		1 : 500	200	16	4
Substrat		1 mg/ml	300	5	37

Tabelle 10: Parameter des ELISA zum Nachweis von PLRV-Antikörpern in Hybridoma-Kulturüberständen

Testschritte	Konzentration/ Verdünnung	Volumen/ Napf (µl)	Inkubation Zeit(h)	Inkubation Temp.(°C)
Coating: Antiserum → PLRV (v.Kaninchen)	1:1 000	200	3	37
PLRV-infizierter Saft v. *Physalis floridana*	1: 10	200	2	37
Blockierung: RSA/ Saline	1%	300	1	20
Kulturüberstände mit Maus-Ak→PLRV	unverdünnt	200	2	37
EMA→Maus-Ak	1: 500	200	16	4
Substrat	1 mg/ml	300	5	37

Als Negativkontrolle wurden Probenpuffer, Kulturüberstand von NS1-Myelomzellen, sowie unbeimpftes Kulturmedium verwendet. Bei allen lag die $Ext._{405nm}$ im ELISA innerhalb der Fehlergrenzen des Messgeräts (+/- 0.025 units). Maus-Antiseren gegen TMV, ArMV, bzw. PLRV dienten jeweils als Positivkontrolle. Als Antikörperpositive Kulturüberstände (virusspezifische Antikörper im Medium nachweisbar) wurden solche gewertet, die im ELISA eine $Ext._{405nm} > 0.050$, gemessen gegen Medium als Nullabgleich, zeigten.

Die Inkubation der Kulturüberstände erfolgte in einem CO_2-begasten Brutschrank bei 10% CO_2/Luft, so dass der pH-Wert des Mediums etwa 7.0 betrug. Dies war notwendig, da das Medium sonst während der Inkubation CO_2 an die Luft abgab und dadurch der pH alkalisch wurde, was zu unspezifischen Reaktionen im ELISA führt (Dietzgen, 1981).

Die von Dietzgen (1981) und Dietzgen & Sander (1982) verwendeten Parameter zum Nachweis von Hybridoma-Antikörpern mit dem ELISA wurden weiter verbessert. Hierdurch konnte die Testempfindlichkeit erhöht, d.h. die Nachweisbarkeitsgrenze gesenkt werden. Da die Konzentration der nach der Fusion ins Medium sekretierten Antikörper bei dicht gewachsenen Zellen nur 0.1 - 10 µg/ml beträgt (Hämmerling, 1980), erhöht dies die Wahrscheinlichkeit, Antikörper-sekretierende Kulturen festzustellen.

2.7.2.3 ELISA zur Bestimmung der Spezifität monoklonaler Antikörper

Die Spezifität der durch Hybridoma-Klone sekretierten, gegen TMV oder ArMV gerichteten Antikörper und die eventuelle Kreuzreaktivität der MCA mit anderen Viren oder Virusstämmen, wurde mit den in Tab. 11 und 12 beschriebenen ELISA-Parametern geprüft. Um den breitesten Bereich von serologisch verwandten Viren oder Virusstämmen erfassen zu können, wurde ein indirektes ELISA-Verfahren verwendet (Koenig, 1981), bei dem gereinigte Viruspartikeln direkt an die Oberfläche von Mikrotiterplatten adsorbiert (Tab. 11) und Viruspartikeln aus infiziertem Pflanzensaft an mit virusspezifischen Antikörpern vorbeschichtete Platten gebunden wurden (Tab. 12).

Zunächst wurden die MCA aus dem Überstand der jeweiligen Hybridoma-Massenkultur mit Ammoniumsulfat gefällt (2.10.1). Von den so angereicherten Globulinen wurde eine Probe (1 mg Protein/ml) im ELISA eingesetzt. Als Positivkontrolle diente gegen das entsprechende Virus gerichtetes Maus-Antiserum.

Tabelle 11: Parameter des ELISA zur Bestimmung der Spezifität monoklonaler Antikörper - I.: Adsorption gereinigter Antigene (Schema 6,A)

Testschritte	Konzentration/ Verdünnung	Volumen/ Napf (µl)	Inkubation Zeit(h)	Inkubation Temp.(°C)
Coating: virale Antigene	1-10 µg/ml	200	3	37
Blockierung: RSA/ Saline	1%	300	1	20
Monoklonale Antikörper	1 mg Protein/ml	200	16	4
EMA→Maus-Antikörper	1 : 500	200	4	37
Substrat	1 mg/ml	300	1,2,5	37

Tabelle 12: Parameter des ELISA zur Bestimmung der Spezifität monoklonaler Antikörper - II.: Antikörper-vorbeschichtete Platten (Schema 6,B)

Testschritte	Konzentration/ Verdünnung	Volumen/ Napf (µl)	Inkubation Zeit(h)	Inkubation Temp.(°C)
Coating: virusspezifische Antiseren gereinigte Antikörper	1:1 000 1 µg/ml	200	3	37
Virale Antigene	1-10 µg/ml	200	2	37
Blockierung: RSA/ Saline	1%	300	1	20
Monoklonale Antikörper	1 mg Protein/ml	200	16	4
EMA→Maus-Antikörper	1: 500	200	4	37
Substrat	1 mg/ml	300	1,2,5	37

Monoklonale Antikörper (MCA) gegen TMV wurden auf ihre Reaktivität mit den TMV-Stämmen *vulgare, dahlemense* und Holmes'Ribgrass, sowie deren Hüllproteinen tryptischen und synthetischen Peptiden von TMVP und Proteinen aus gesunden Tabakpflanzen, *Nicotiana tabacum* cv Xanthi (Negativkontrolle), untersucht, wobei 10 µg Antigen/ml zum Beschichten der Mikrotiterplatten verwendet wurde. Gereinigtes ArMV (5 µg/ml) und PLRV (1 µg/ml) wurde ebenfalls an Testplatten adsorbiert und die Bindung der MCA geprüft. Die jeweiligen Konzentrationen des Antigens für die Beschichtung der Mikrotiterplatten hatten sich aufgrund von Vorversuchen (Tab. 6, 7, 20) als optimal für die Testempfindlichkeit erwiesen.

Bei Verwendung von Antikörper-vorbeschichteten Platten wurden dieselben Antigen-Konzentrationen verwendet und die Antigene durch die virusspezifischen Antikörper serologisch gebunden. Das Beschichten der Platten (Coating) mit virusspezifischen Antikörpern erfolgte mit 1 µg gereinigten AK gegen TMV/ml, sowie einer 1:1 000 Verdünnung des Antiserums gegen ArMV bzw. PLRV.

Monoklonale Antikörper gegen ArMV wurden ausschliesslich auf Antikörper-vorbeschichteten Platten auf ihre Spezifität untersucht. Dazu wurden die ArMV-Stämme AB 10(ATCC), S, E, und ivy verwendet. Sie lagen in infizierten Gurken- oder Petunienpflanzen vor, deren Saft für den ELISA 1:10 mit Probenpuffer verdünnt wurde (Negativkontrolle 1:10 verdünnter Saft von gesunden Gurken- oder Petunienpflanzen). Die Virionen dieser Virusstämme, wie auch gereinigtes ArMV (5 µg/ml) und ArMVP (10 µg/ml) wurden durch zuvor adsorbierte Antikörper aus Antiserum gegen ArMV (vom Kaninchen) an die Mikrotiterplatten gebunden.

Das eventuelle Auftreten einer Kreuzreaktivität der MCA mit PLRV und/oder TMV bzw. TMVP wurde ebenfalls mit dem ELISA überprüft. Dazu wurde 1:10 mit Probenpuffer verdünnter Saft von verschiedenen, mit PLRV-Isolaten infizierten Pflanzen von *Physalis floridana* (Negativkontrolle: 1:10 verdünnter Saft von gesunden *P. floridana*) durch Antiserum gegen PLRV, sowie TMV und TMVP (10 µg/ml) durch gereinigte Antikörper (γ-Globulinfraktion) eines Antiserums gegen TMV, an die Näpfe von Mikrotiterplatten gebunden.

Die Spezifität von durch Affinitäts-Chromatographie an Protein A - Sepharose gereinigten MCA wurde mit den gleichen Parametern (Tab. 11, 12) im ELISA überprüft. Die Nachweisbarkeitsgrenze gereinigter MCA wurde anhand einer Verdünnungsreihe mit den gleichen ELISA-Verfahren ermittelt.

2.7.2.4 ELISA zur Bestimmung der Immunoglobulin-Klassen und -Subklassen von monoklonalen Antikörpern

Zur Charakterisierung der monoklonalen Antikörper wurde die Immunoglobulin (Ig)-Klassen und -Subklassen-Zugehörigkeit nach der in Schema 7 dargestellten ELISA-Methode entsprechend den Parametern von Tabelle 13, festgestellt.

Mit dieser ELISA-Variante wurde gleichzeitig die Antigen-Spezifität und die Ig-Klasse der MCA bestimmt.

Schema 7: ELISA zur Bestimmung der Ig-Klassen und -Subklassen von monoklonalen Antikörpern

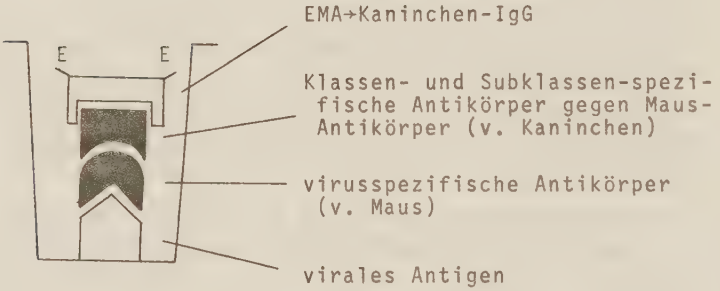


Tabelle 13: Parameter des ELISA zur Bestimmung der Ig-Klassen und -Subklassen von monoklonalen Antikörpern (MCA)

Testschritt	Konzentration/ Verdünnung	Volumen/ Napf (µg)	Inkubation Zeit(h)	Inkubation Temp.(°C)
Coating: TMVP / ArMV	10 µg/ml	50	3	37
Blockierung: RSA/ Saline	1%	100	1	20
MCA (v. Maus)	4-7 mg Protein/ml	50	3	37
Ig-Klassen und -Subklassenspezifische Ak→Maus-Ak (v.Kan.)		50	16	4
EMA→Kaninchen-IgG	1:1 000	50	3	37
Substrat	1 mg/ml	100	1,2	37

Als Probe der monoklonalen Antikörper wurden gefällte Kulturüberstände von MCA-sekretierenden Hybridomas unverdünnt verwendet, da nur eine qualitative Aussage erforderlich war. Als Positivkontrolle der Ig-Klassen und -Subklassen von Mäuse-Antikörpern wurden gereinigte monoklonale Maus-Myelomaproteine (50 µg/ml), IgA, IgM, IgG_1, IgG_{2_a}, IgG_{2_b}, IgG_3, sowie κ- und λ-leichte Ketten, und als Negativkontrolle Probenpuffer verwendet. Folgende Klassen- und Subklassen-spezifischen Kaninchen-Ak gegen Maus-Ak wurden verwendet: anti-IgA(Fc), anti-IgM, anti-IgG_1, anti-IgG_{2_a}, anti-IgG_{2_g}, anti-IgG_3, anti-κ-leichte Kette und anti-λ-leichte Kette. Als Negativkontrolle diente Kaninchen-Normalserum.

2.8 FUSION VON MAUS-MYELOMZELLEN MIT MILZZELLEN VON PFLANZENVIRUS-IMMUNISIERTEN MÄUSEN

Alle mit Zellkulturen in Verbindung-stehenden Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle Zellen wurden bei 37°C, 10% CO_2 und 90% relativer Luftfeuchte kultiviert. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (DMEM) + 10% Fötales Kälberserum (FCS) verwendet. HAT-Selektionsmedium, in dem ausschliesslich Hybridzellen aus Milz- und Myelomzellen wachsen können (Köhler *et al.*, 1976), bestand aus DMEM + 20% FCS mit $1x10^{-4}$M Hypoxanthin, $4x10^{-7}$M Aminopterin und $1.6x10^{-5}$M Thymidin.

Neu gebildete Hybridomas (somatische Zellhybride) benötigen für optimales Wachstum die Anwesenheit von "feeder"-Zellen.

Peritoneale Makrophagen (MØ) sind als "feeder layer" besonders effektiv, da sie neben der Sekretion von Wachstumsfaktoren auch Zelltrümmer von in HAT-Medium abgestorbenen Zellen entfernen (Hämmerling & Hämmerling, 1981). Sie wurden deshalb hier verwendet.

Diese Makrophagen wurden aus dem Bauchraum gesunder STU-Mäuse isoliert (Fazekas de St. Groth & Scheidegger, 1980), die zuvor in 70% Ethanol oberflächensterilisiert worden waren. Die Peritonealzellen wurden durch 2x Spülen des Bauchraumes mit je 5 ml 0.34 M Sucroselösung extrahiert. Die Zahl der Makrophagen (2.5 - 5 x 10^6/Maus), die etwa die Hälfte der Peritonealzellen ausmachen, wurde mit einer Thoma-Zählkammer bestimmt, die Zellen sedimentiert (Christ-Minifuge, 1 200 Upm, 10 min, 4°C), in HAT-DMEM + 20% FCS in einer Konzentration von 1 x 10^6 MØ/ml suspendiert, und 50 µl der Suspension (5 x 10^4 MØ) pro Napf einer 24-Napf-Gewebekulturplatte, zu 1 ml HAT-Medium, am Tag vor der Zellfusion, zugegeben und inkubiert.

Der optimale Zeitpunkt für die Zellhybridisierung liegt 3-4 Tage nach der letzten, intravenösen Injektion des Antigens. Zu dieser Zeit ist in der Milz der Mäuse die Zahl der spezifisch gegen das Pflanzenvirus gerichteten, und zur Fusion geeigneten B-Lymphozyten am höchsten (Claflin & Williams, 1978).

Für die Zellhybridisierung wurde die von Hämmerling (1977) beschriebene Technik modifiziert (Dietzgen & Sander, 1982).

Die für die Zellfusion benutzte Mäuse-Myelomzellinie, P3-NS1/1-Ag4-1 (Köhler *et al.*, 1976), die eine leichte κ-Immunoglobulinkette produziert, aber nicht sekretiert, wurde in Suspensionskultur in DMEM + 10% FCS vermehrt.

Die Myelomzellen wurden sedimentiert (Christ-Minifuge, 800 Upm, 10 min, 4°C), mehrfach mit Dulbecco's Phosphat-gepufferter Saline (DPBS), pH 7.2 gewaschen, zuletzt in 5 ml DPBS resuspendiert und bei 37°C in einem Wasserbad gelagert.

Die Maus mit dem jeweils höchsten Antikörper-Titer vor der letzten Immunisierung wurde zur Zellfusion herangezogen. Zunächst wurde zur späteren Bestimmung des aktuellen Serumantikörper-Titers (2.7.2.1) Blut entnommen, die Maus anschliessend getötet und in 70% Ethanol oberflächensterilisiert. Die Milz wurde entnommen, in DPBS gewaschen, Bindegewebe und Fett entfernt, mit einer Schere zerschnitten und die Gewebestücke durch ein Siebchen in DPBS homogenisiert. Die Milzzellen wurden sedimentiert (Christ-Minifuge, 1 000 Upm, 10 min, 20-22°C), in 5 ml DPBS resuspendiert, bei 37°C gelagert und die Zellzahl bestimmt.

Milzzellen und Myelomzellen wurden im Verhältnis 2:1 bis 10:1 gemischt, wobei 1-2 x 10^8 Milzzellen und 1-6 x 10^7 Myelomzellen verwendet wurden. Die Zellmischung wurde sedimentiert (Christ-Minifuge, 1 000 Upm, 10 min, 37°C), der Oberstand sorgfältig abgesaugt, sowie das Sediment aufgelockert und durch mildes Schütteln in 0.7 ml 50% PEG-Lösung (20°C)/ 10^8 Zellen resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei 37°C wurde die Suspension unter mildem Schütteln durch tropfenweise Zugabe von 10 ml DPBS (37°C) langsam verdünnt und 5 min bei 20-22°C inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut sedimentiert und der Überstand abgesaugt. Den sedimentierten Zellen wurde 4 ml HAT-DMEM + 20% FCS/10^8 Zellen zugesetzt. Nach 5-10 min Inkubation wurden die Zellen vorsichtig suspendiert, ohne alle Zellaggregate zu zerstören und 1 Tropfen der Fusionsmischung (≈1x10^6 Zellen) pro Napf zugegeben. Jeder Napf war mit 1 ml HAT-Medium + 5x10^4 MØ vorinkubiert worden (Costar 24 well Cluster Gewebekulturschalen).

2.9 SELEKTION, KLONIERUNG UND KULTUR VON ANTIKÖRPER-SEKRETIERENDEN HYBRIDOMAS

Nach 7 Tagen wurde in jeden Napf 1 ml HAT-Medium zugegeben und danach 1x pro Woche 1 ml Medium entnommen und durch frisches HAT-Medium ersetzt. Die Kulturschalen wurden 2-3x pro Woche mit einem Umkehrmikroskop auf Wachstum von Hybridomas und Kontamination überprüft. Etwa 2 Wochen nach der Fusion konnten wachsende Hybridomas beobachtet werden. Solche Kulturen wurden 2x mit HT-Medium gefüttert, bevor sie an DMEM + 10% FCS angepasst wurden.
Zum Nachweis Antikörper-sekretierender Hybridomas wurden die Kulturüberstände mit dem ELISA auf virusspezifische Antikörper überprüft (2.7.2.2).
Wachsende Hybridomas, die virusspezifische Antikörper sekretierten, wurden möglichst früh subkultiviert und kloniert, jedoch frühestens 3 Wochen nach der Zellfusion, da erst ab diesem Zeitpunkt aus positiven ELISA-Ergebnissen sicher auf Ak-sekretierende Hybridomas geschlossen werden kann (Dietzgen & Sander, 1982). Wenn eine Hybridomakultur, die einen gewünschten Antikörper sekretiert, gefunden wurde, erfolgte mit einem Teil der Zellen des entsprechenden Näpfchens sofort eine Klonierung. Dies war notwendig, um das Überwachsen durch nichtsekretierende Hybridoma-Varianten zu verhindern und bei mehr als einem Klon in diesem Napf, die gewünschte Hybridomalinie von irrelevanten Zellen oder Zellen einer zweiten Ak-produzierenden Hybridomalinie abzutrennen. Die nach der Klonierung verbliebenen Zellen der positiven Kultur wurden zum Teil in flüssigem Stickstoff konserviert (2.9.2) und der Rest weiter kultiviert.

Eine Woche nach der Klonierung wurden mit dem Umkehrmikroskop sichtbare Klone einzeln in 1 ml-Kulturen mit $2x10^4$ MØ als feeder Zellen übertragen und nach 1-2 Wochen die Kulturüberstände mit dem ELISA auf virusspezifische Antikörper überprüft. Positive Hybridomaklone wurden weitere 1-2 Mal rekloniert (2.9.1), um sicher zu gehen, Zellinien klonalen Ursprunges zu haben, die stabil in der Produktion virusspezifischer Antikörper sind. Dabei erhöhte sich die Klonierungseffizienz und der Anteil positiver Kulturen nach jeder Reklonierung. Die Kulturüberstände wachsender Hybridomas wurden nach jeder Klonierung mit dem ELISA getestet. Eine Probe jeder Ak-sekretierenden Hybridomaklone wurde zur Konservierung in flüssigem Stickstoff eingefroren (2.9.2).

Reklonierte virusspezifische Antikörper-sekretierende Hybridomas wurden schliesslich in grössere Kulturgefässe expandiert und dort als Massenkultur vermehrt.

2.9.1 Klonierung durch limiting dilutions

Hybridomalinien sind abhängig von feeder Zellen, deren Verwendung während der Klonierung besonders kritisch ist. Zur limiting dilution Klonierung wurden peritoneale Makrophagen (2.8) in einer Konzentration von $2x10^4$/ml Klonierungsmedium als feeder Zellen benutzt.

Bei der Klonierung durch limiting dilutions wird eine begrenzte Zahl von Zellen zu 96-Napf-Gewebekulturplatten zugegeben, wobei die Zahl der Zellen der ursprünglichen Kultur gezählt und so verdünnt werden sollte, dass etwa die Hälfte der Näpfe nur eine Zelle erhält.

Die Zellen werden mit 10, 3 und 0.5 Zellen/Napf in 200 µl DMEM + 20% FCS (Klonierungsmedium) + $2x10^4$ MØ/ml plattiert (Goding, 1980).

Da die Hybridomas sehr in ihrer Klonierungseffizienz, Dichteabhängigkeit und optimalen Wachstums- und feeder layer- Bedürfnissen variieren, war es in der Praxis besser und sicherer, eine geringe Zahl von Zellen zu entnehmen und sie in mehreren Verdünnungen zu plattieren, um entsprechend der Poisson-Verteilung Klonalität sicherzustellen (Hämmerling & Hämmerling, 1981). Zwei bis 5 µl Hybridzellsuspension wurde in 30 ml Klonierungsmedium mit $2x10^4$ MØ/ml verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden 200 µl/Napf einer 96-Napf-Gewebekulturplatte mittels einer Multikanalpipette plattiert. Die verbliebenen 10 ml Zellsuspension wurden mit 20 ml feeder-Zellen enthaltendem Klonierungsmedium verdünnt, 200 µl/Napf plattiert und der ganze Vorgang noch einmal nach Verdünnung mit weiteren 10 ml Medium wiederholt. Wachsende Klone wurden nach 1-2 Wochen in 1 ml-Kulturen mit dem gleichen Medium "gepickt".

2.9.2 Konservierung von Hybridomas

Aliquoten von wachsenden, den gewünschten Antikörper produzierenden Hybridoma-Kulturen wurden sofort durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff konserviert (Fazekas de St. Groth & Scheidegger, 1980; Schreier *et al.*, 1980; Dietzgen, 1981), um den Verlust von Hybridomalinien aufgrund von Überwachsen durch nichtproduzierende Zellen, Verlust von Chromosomen, Kontamination und technischen Gründen zu verhindern.

Sedimentierte Zellen wurden auf Eis in DMEM + 20% FCS + 10% DMSO aufgenommen, in Portionen zu 0.5 - 1 ml in sterile Ampullen gefüllt, einen Tag bei -70°C in einer Styroporbox langsam eingefroren, und anschliessend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Das Auftauen erfolgte schnell, in einem 37°C-Wasserbad, gefolgt von der Sedimentation der Zellen (Christ-Minifuge, 1 000 Upm, 10 min, 4°C), dem sofortigen Entfernen des Überstandes und Resuspension in DMEM + 20% FCS + $2x10^4$ MØ/ml in hoher Zelldichte und sofortiger Subkultivierung in mehreren 1 ml-Kulturen oder limiting dilution Klonierung. Etwa 40-60% lebender Zellen (Färbung abgestorbener Zellen mit Trypanblau) konnten so wiedergewonnen werden (Goding, 1980; Dietzgen & Sander, 1982).

Die gleichen Methoden wurden auch zur Lagerung der Myelomzellen verwendet.

2.10 HERSTELLUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER *IN VITRO* UND DEREN REINIGUNG

Nach der Isolierung stabiler, virusspezifische Antikörper-sekretierender Hybridoma-Klone wurden die Zellen in grössere Kulturgefässe expandiert. Ausgehend von 2 ml-Suspensionskulturen wurden die Zellen zuerst in 50 ml-Gewebekulturflaschen und dann nach Vereinigung des Inhaltes mehrerer kleiner Kulturflaschen entweder in 650 ml-Gewebekulturflaschen liegend in einem CO_2-begasten Brutschrank, oder in 670 ml-Rollerkulturflaschen bei 0.5 Upm, in DMEM + 20% FCS + 10% NCTC 135 inkubiert. Durch Zugabe von feeder-Zellen zu den 50 ml-Kulturen ($2x10^4$ MØ/ml) wurde Wachstum und Antikörper-Produktion verbessert.

Ein Aliquot der Hybridomazellen der 50 ml-Kulturen wurde zur Konservierung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Drei Tage vor dem Ernten des MCA-haltigen Kulturüberstandes von 500 ml-Massenkulturen wurde Serumfreies Medium gefüttert. Damit wurde die durch FCS bedingte Proteinmenge im Medium verringert, und gleichzeitig die Ausbeute an monoklonalen Antikörpern erhöht, da die Zellen nach 2-3 Tagen lysieren und dadurch zusätzlich intrazelluläre MCA freisetzen.

Die MCA wurden durch Fällung der Globuline aus dem Kulturüberstand mit 50% gesättigtem Ammoniumsulfat konzentriert. Solche Präparationen enthalten neben den MCA auch noch aus dem Serumzusatz des Kulturmediums ko-präzipitierte Proteine und wurden daher zur Isolierung der MCA durch Affinitäts-Chromatographie an Protein A-Sepharose gereinigt.

2.10.1 Fällung monoklonaler Antikörper aus Kulturmedium mit Ammoniumsulfat

Ein Volumen Kulturüberstand wurde mit 1 Volumen gesättigter $(NH_4)_2SO_4$-Lösung gemischt und 1 h auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (Sorvall, GSA-Rotor, 6 000 Upm, 10 min, 4°C) sedimentiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 20 mM Tris-HCl + 40 mM NaCl, pH 7.8 resuspendiert und gegen 50-100 Volumen 20 mM Tris-HCl + 20 mM NaCl, pH 7.8 etwa 8 h bei 4°C dialysiert.

Der Dialysierschlauch wurde dazu möglichst hoch in einem 2 000 ml-Messzylinder angebracht, der Puffer nach 3-4 h gewechselt und während der Dialyse nicht gerührt, so dass das $(NH_4)_2SO_4$ zu Boden strömte (Schreier *et al.*, 1980; Jonak, 1980). Präzipitiertes, denaturiertes Protein wurde durch Zentrifugation (Sorvall, SS-34-Rotor, 11 000 Upm, 10 min, 4°C) entfernt, der Überstand sorgfältig abgenommen, Volumen sowie die Extinktion bei 280 nm Wellenlänge bestimmt, und bei -70°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde anhand des Extinktionskoeffizienten für Antikörper ($Ext._{280nm}$ 1.4 = 1 mg/ml) geschätzt.

2.10.2 Reinigung monoklonaler Antikörper durch Affinitäts-Chromatographie an Protein A - Sepharose

In 15 ml 0.1 M Phosphatpuffer nach Sörensen (SPP), pH 8.0 wurde 1.5 g Protein A - Sepharose für 30 min bei 4°C gequollen, eine Whatman-Chromatographiesäule (Länge: 20 cm; Innendurchmesser: 0.9 cm) mit dem Gel gepackt (Bettvolumen etwa 5 cm^3) und mit 0.1 M SPP, pH 8.0 äquilibriert. Das Gel enthält 2 mg Protein A/ml und hat eine Bindekapazität von 20 mg Mäuse-Immunoglobulin. Die Chromatographie wurde anfangs bei 4°C, später bei 20-22°C, mit einer Laufgeschwindigkeit von 20-40 ml/h durchgeführt. Um bakterielles Wachstum zu verhindern, wurde den Puffern 10 mM NaN_3 zugesetzt.

Zur Reinigung der monoklonalen Antikörper wurden von Zelltrümmern durch Zentrifugation befreite Hybridoma-Kulturüberstände unmittelbar oder nach Anreicherung durch Ammoniumsulfat-Fällung und anschliessende Dialyse verwendet (Goding, 1980).

Vier Volumen des Kulturüberstandes wurden mit 1 Volumen 0.5 M SPP, pH 8.0 vermischt und langsam auf das Gel aufgetragen (Schreier *et al.*, 1980). Das Gel wurde mit 0.1 M SPP, pH 8.0 gewaschen (bis zu 5 Volumen des aufgetragenen Kulturüberstandes), bis im Eluat kein Protein mehr nachweisbar war. Zur Elution der gebundenen IgG wurde das Gel mit 0.1 M Essigsäure + 15 M NaCl, pH 2.6 (bis zu 3 Volumen des aufgetragenen Kulturüberstandes) gespült und die eluierten Proteine sofort neutralisiert, gegen PBS dialysiert, und die Reaktivität mit dem Antigen im ELISA (Tab. 11) gemessen. Nach der Elution wurde das Gel mit 0.1 M SPP, pH 8.0 gewaschen und konnte erneut verwendet werden.

2.11. CHARAKTERISIERUNG VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN

Die hergestellten monoklonalen Antikörper wurden zur Charakterisierung von antigenen Determinanten der untersuchten Viren strukturell und funktionell untersucht.

2.11.1 Die Homogenität der Hybridomalinien wurde durch wiederholte Reklonierungen sichergestellt (Methoden 2.9).

2.11.2 Bestimmung des Antikörper-Isotyps

Für die Auswahl der immunologischen Tests zur Charakterisierung von Antigenen mit den entsprechenden monoklonalen Antikörpern und für die Interpretation der Ergebnisse, wurden die Antikörper-Klasse und -Subklasse mit dem ELISA (Tab. 13) bestimmt.

2.11.3 Bestimmung der Antikörper-Spezifität

Die Spezifität der MCA für die untersuchten viralen Antigene wurde durch Bindungstests an komplette Viruspartikeln und gereinigte virale Komponenten mit dem ELISA (Methoden 2.7.2.3) festgestellt.

2.11.4 Neutralisation der Infektiosität von TMV

Mit dem funktionellen Virus-Neutralisationstest sollte der Verlust von Infektiosität bestimmt werden, der durch die Bindung von Antikörpern an die Oberfläche der Virionen entsteht.

TMV und Antikörper wurden in 0.02 M SPP, pH 6.0 verdünnt und gemischt. Die Antikörper sollten dabei im Überschuss vorliegen. Vor dem Auftragen auf die Testpflanzen wurden die Virus/Antikörper-Mischungen über Nacht bei 4°C inkubiert (Anderer & Schlumberger, 1965). Die verwendeten TMV-Konzentrationen betrugen $1x10^{-5}$, $1x10^{-6}$ und $1x10^{-7}$ g/ml. Die monoklonalen Antikörper wurden entweder in Form von gefällten und dialysierten Hybridoma-Kulturüberständen (100-1 000 µg Protein/ml) oder über Protein A - Sepharose gereinigt (10-100 µg MCA/ml) verwendet. Um die nicht-spezifische Hemmung der Infektiosität durch andere Proteine (Anderer & Schlumberger, 1965) zu bestimmen, wurden Antikörper aus Kaninchen-Normalserum und aus Antiserum gegen Kartoffelvirus X als Negativkontrolle verwendet. Als Positivkontrolle dienten polyklonale Antikörper aus Antiserum gegen TMV (vom Kaninchen). Die Konzentration dieser Antikörper aus den Seren betrug in den Biotests 10-1 000 µg/ml.

Mit jeder Probenkombination (Virus/Ak) wurden 3 Pflanzen von *Nicotiana tabacum* cv Xanthi nc mit je 5 Blättern, mit Korund bestäubt, im Halbblatt-Test infiziert und nach 1 Woche Inkubation die Läsionen pro Halbblatt gezählt. Pro Halbblatt wurden 0.2 ml der Probe appliziert. Auf dem gleichen Blatt wurde auf einer Blatthälfte TMV in Puffer (=Standard) und auf der anderen Hälfte die gleiche TMV-Konzentration, gemischt mit Antikörpern, aufgetragen. Drei Pflanzen mit je 5 Blättern wurde mit je 0.3 ml Puffer/Ganzblatt beimpft (=Pufferkontrolle). Insgesamt wurden 3 getrennte Biotests mit zusammen 240 Testpflanzen durchgeführt, wobei die Neutralisation der Infektiosität durch die Kontrollen und einige MCA wiederholt untersucht wurde.

Der Biotest wurde nach folgender Formel ausgewertet:

$$\text{Hemmung der Infektiosität (\% des Standards)} = 100 - \left(\frac{\text{Läs./Hb } \{\text{TMV+Ak}\}}{\text{Läs./Hb } \{\text{TMV}\}} \times 100\right)$$

Dazu wurden von jeweils 15 Blatthälften die durchschnittliche Läsionenzahl (Läs.)/Halbblatt (Hb) von TMV-Standard ({TMV}), sowie TMV-Standard + Antikörper ({TMV+Ak}) berechnet.

III. E R G E B N I S S E

1. VIRUSREINIGUNG UND -CHARAKTERISIERUNG

Zur Immunisierung von Mäusen zur späteren Hybridisierung der Milzzellen, sowie zur Beschichtung von Mikrotiterplatten für den Nachweis von Antikörpern mit dem ELISA, wurden gereinigte Viruspräparationen hergestellt und die Reinheit anhand verschiedener Kriterien geprüft.

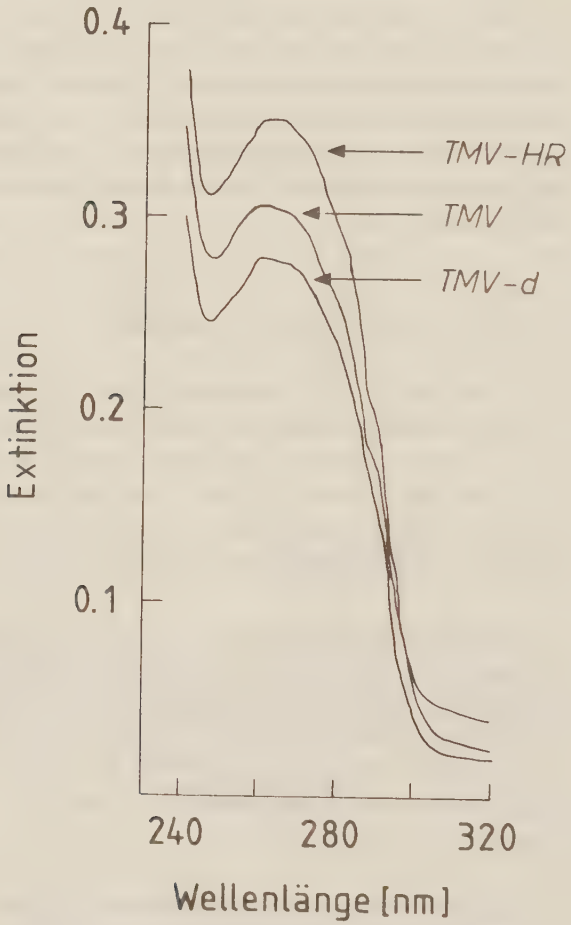
1.1 Tabak Mosaik Virus (TMV)

TMV befindet sich in höheren Konzentrationen als die meisten anderen Viren in infizierten Pflanzen und kann in grosser Menge isoliert werden. Bei der Reinigung der TMV-Stämme *vulgare*, *dahlemense* und Holmes' Ribgrass wurden Ausbeuten von bis zu 155 mg/100 g Blattmaterial erzielt (Tab. 14).

Die UV-Absorptionsspektren der gereinigten TMV-Stämme (Abb. 1) zeigten das für TMV typische Absorptionsmaximum bei 260 nm und ein -minimum bei 248 nm Wellenlänge (Noordam, 1973). Das charakteristische Verhältnis $Ext._{260/280nm}$ betrug bei allen 3 TMV-Stämmen etwa 1.20 und entsprach damit den Literaturwerten (Tab. 14).

Anhand der Absorptionsspektren und der elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 5) konnte die Reinheit der isolierten TMV-Stämme gezeigt werden.

Abb. 1: UV-Absorptionsspektrum von gereinigten TMV-Stämmen



TMV-Stämme: TMV (= Typstamm, *vulgare*), *d* (= *dahlemense*) und HR (= Holmes'Ribgrass)

Tabelle 14: Reinigung von TMV-Stämmen

TMV-Stamm	Virusausbeute (mg/100 g Blätter)	Ext.$_{260/280nm}$	
		I	II
vulgare	114	1.20	1.19[a]
dahlemense	155	1.20	1.17[b]
Holmes'Ribgrass	87	1.20	1.20[c]

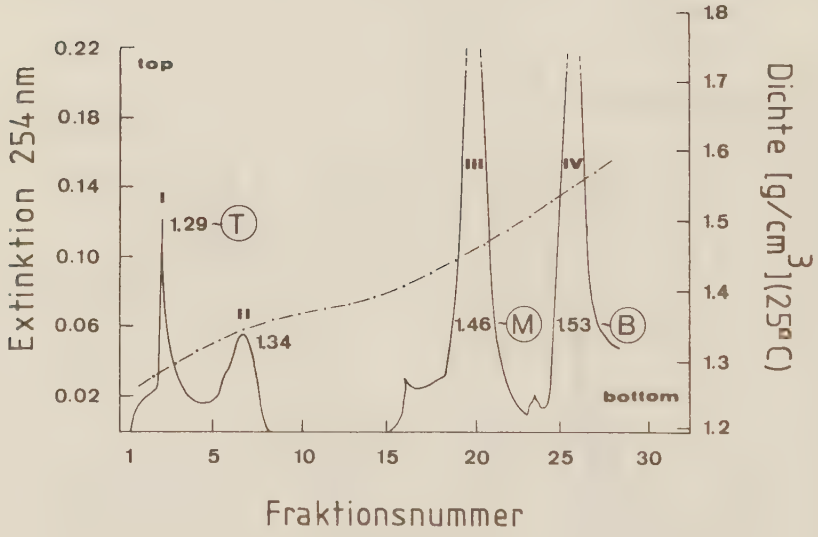
I: Das Extinktionsverhältnis 260/280 nm Wellenlänge der gereinigten TMV-Stämme wurde anhand der UV-Absorptionsspektren (Abb. 1) berechnet.
II: Literaturwerte: a) Zaitlin (1975); b) Hollings & Huttinga (1976); c) Oshima & Harrison (1975).

1.2 Arabis Mosaik Virus (ArMV)

Bei der Reinigung von ArMV in einem CsCl-Dichtegradienten (Abb. 2) traten 4 Peaks auf, von denen 3 anhand der Schwebdichte in CsCl, der Ext.$_{260/280nm}$ und elektronenmikroskopischer Untersuchungen als T-, M-, und B-Komponenten des Virus (Matthews, 1982), identifiziert werden konnten (Tab. 15).

Nach Vereinigung der gereinigten ArMV-Komponenten wurde ein UV-Absorptionsspektrum (Abb. 3) aufgenommen und Ext.$_{260/280nm}$ = 1.7 festgestellt, was auf einen hohen Gehalt an M- und B-Komponenten schliessen lässt.

Abb. 2: Absorptionsprofil von ArMV in einem CsCl-Dichtegradienten und Dichteverlauf



0.4 mg ArMV wurden in 11 ml 0.033 M SPP, pH 7.5 mit 6.87 g CsCl (38.5% (w/v) suspendiert.
Zentrifugation: Spinco-Beckman L5-65, SW 40-Rotor, 36 000 Upm, 45 h, 15°C
Fraktionierung: 1 ml/min, 60 cm/h, 12 Tropfen/Fraktion
Komponenten von ArMV: (T) = Top, (M) = Middle, (B) = Bottom, jeweils mit Dichteangabe.

Tabelle 15: Charakterisierung der Komponenten von ArMV im CsCl-Dichtegradient

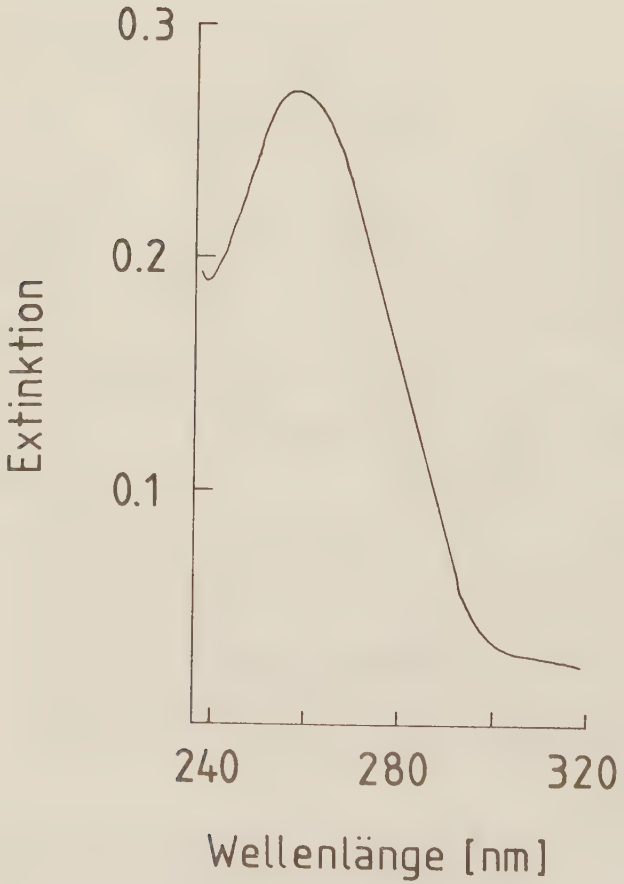
	Komponenten von ArMV		
	Top (T)	Middle (M)	Bottom (B)
Schwebdichten in CsCl (g/cm³) bei 25°C	1.29 (1.28)[a]	1.46 (1.43-1.48)[a]	1.53 (1.51-1.53)[a]
$Ext._{260/280nm}$	1.06 (0.7-0.8)[b]	1.65 (1.4-1.8)[b]	1.70 (1.7-1.8)[b]

[a] Matthews, (1982); [b] Murant, (1981).

In den elektronenoptischen Aufnahmen (Abb. 5) wurden innen nicht kontrastierte Partikeln (RNA-2) als B-, innen nur wenig kontrastierte Partikeln (RNA-1) als M-, und innen stark kontrastierte Partikeln (keine RNA) als T-Komponenten identifiziert.

Die Virusausbeuten bei der Reinigung betrugen 250-500 µg ArMV/100 g infizierter Gurkenpflanzen.

Abb. 3: UV-Absorptionsspektrum von ArMV

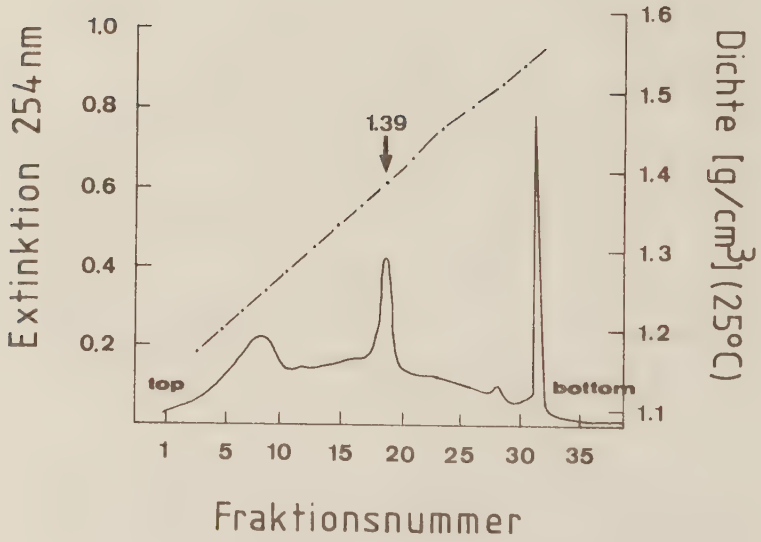


1.3 Potato Leafroll Virus (PLRV)

Gereinigtes PLRV bandete in einem diskontinuierlichen 30-45% (w/w) CsCl-Dichtegradienten bei einer Schwebdichte von 1.39 (Abb. 4), was mit dem von Rowhani & Stace-Smith (1979) ermittelten Wert übereinstimmt. Das Vorkommen von PLRV in dieser Fraktion wurde elektronenmikroskopisch (Abb. 5) und mit dem ELISA (Tab. 2) nachgewiesen. Obwohl sich die gereinigte PLRV-Präparation im elektronenoptischen Bild homogen zeigte (Abb. 5), war wegen einer leichten bräunlichen Färbung, die auch durch weitere Reinigung nicht entfernt werden konnte, keine genaue Bestimmung der Konzentration und Virusausbeute möglich. Das Verhältnis der $Ext._{260/280nm}$ betrug etwa 1.0 und war nicht mit den von Gugerli (1979) und Takanami & Kubo (1979) bestimmten Werten von 1.5-1.7 bzw. 1.78 vereinbar. Möglicherweise sind durch die Driselase-Behandlung zum Aufschluss des Pflanzenmaterials kleine, oxidierte Pflanzenproteine fest an das Virus adsorbiert (Gugerli, persönliche Mitteilung).

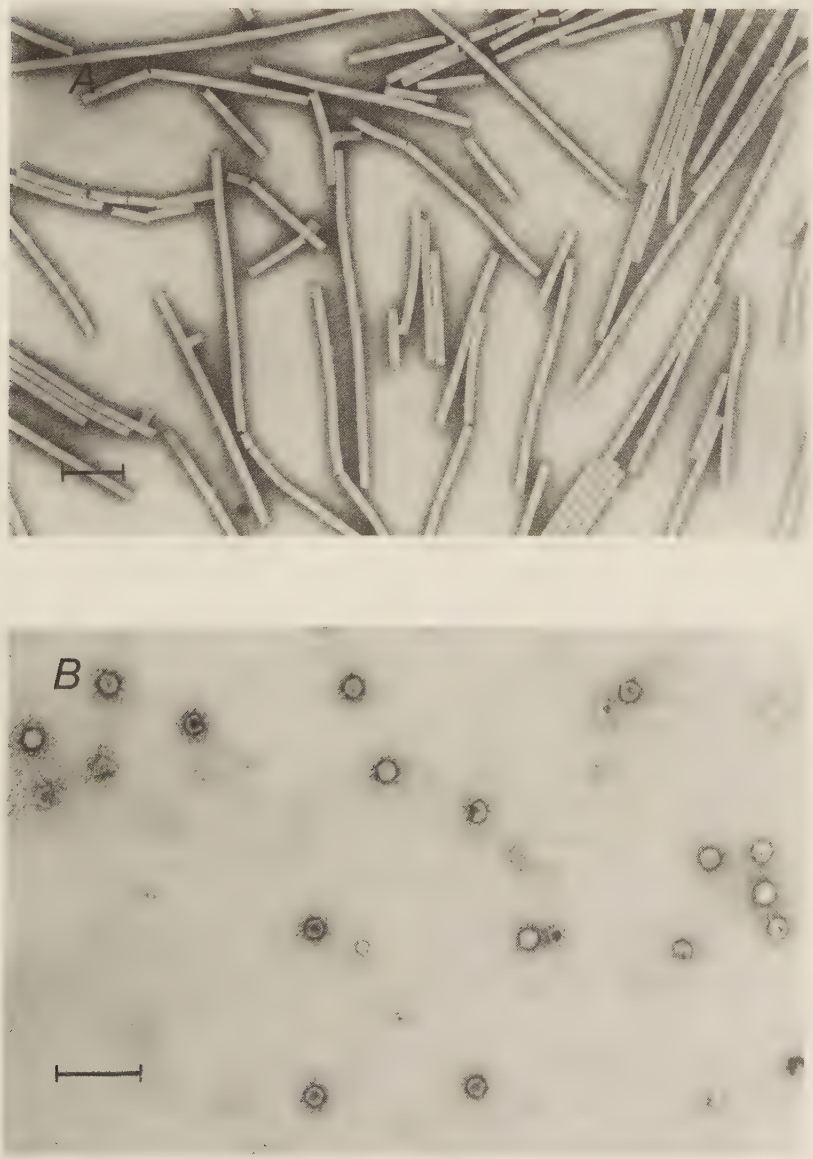
Zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen PLRV mit dem ELISA wurden daher Virionen aus nicht mit Driselase behandeltem Saft PLRV-infizierter Pflanzen verwendet und an Antikörper-vorbeschichtete Mikrotiterplatten gebunden (Tab. 8, 10).

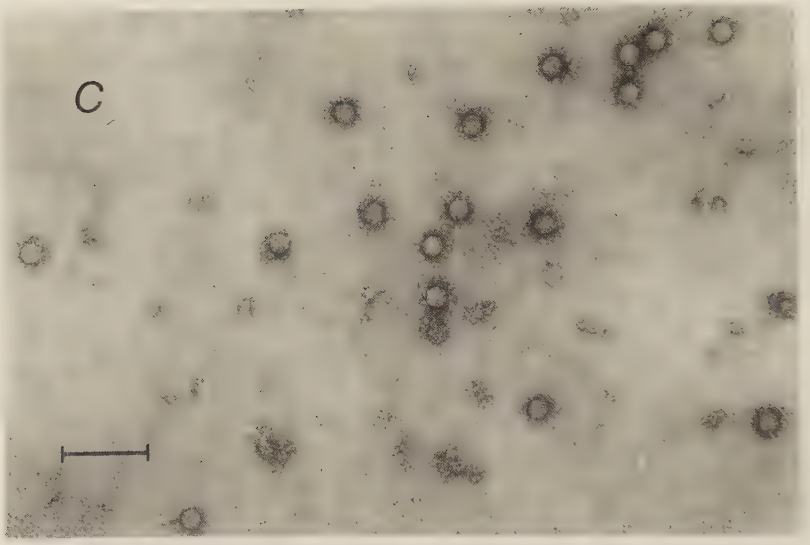
Abb. 4: Absorptionsprofil von PLRV in einem CsCl-Dichtegradienten und Dichteverlauf



Diskontinuierlicher CsCl-Dichtegradient aus je 1 ml 30, 35, 40, 45% CsCl (w/w) in 0.018 M CPP, pH 7.0 überschichtet mit 0.6 ml PLRV-Suspension
Ultrazentrifugation: Spinco-Beckman L5-65, SW 50.1-Rotor, 44 000 Upm; 300 min, 15°C
Fraktionierung: 0.5 ml/min, 60 cm/h, 6 Tropfen/Fraktion

Abb. 5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der gereinigten Virionen





Die Virus-Präparate wurden mit 1% Uranylacetat negativ kontrastiert und in einem Siemens Elektronenmikroskop 1a bei 80kV Strahlspannung untersucht.

(A) TMV *vulgare*, nach differentieller Zentrifugation
(B) ArMV, nach Sucrosegradienten-Zentrifugation
(C) PLRV, nach CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation

Die Grössenskala entspricht 100 nm Originalgrösse.

2. REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES TMV-HÜLLPROTEINS UND DESSEN TRYPTISCHER PEPTIDE

2.1 Hüllproteine der isolierten TMV-Stämme

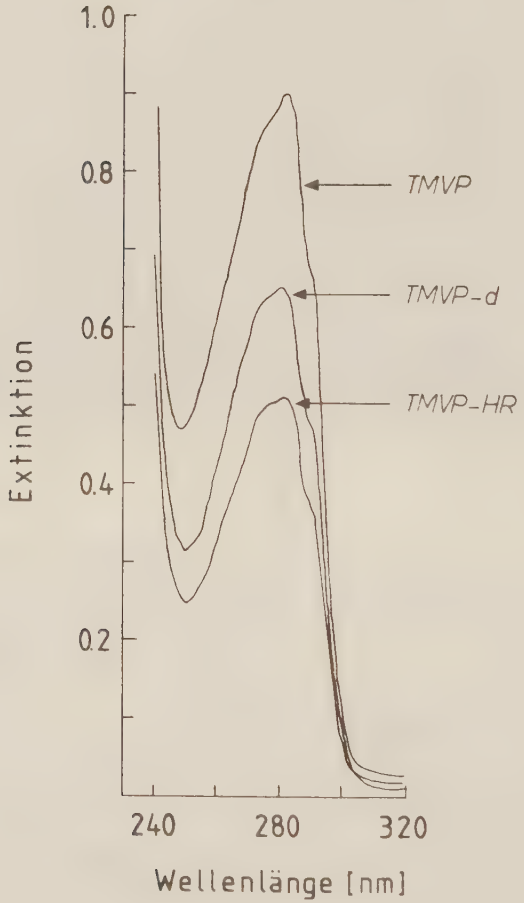
Das Absorptionsspektrum der isolierten TMV-Proteine (TMVP) zeigte das für Proteine charakteristische Maximum bei 280nm und ein Minimum bei 250nm Wellenlänge (Abb. 6). Das Verhältnis von $Ext._{max/min}$ (Tab. 16) lag in dem von Fraenkel-Conrat (1957) angegebenen Bereich von 2.0-2.2.

Tabelle 16: Reinigung von TMV-Hüllprotein

Hüllprotein der TMV-Stämme	Ausbeute (% des eingesetzten Virus)	$Ext._{max/min}$
vulgare	75.0%	2.16
dahlemense	74.4%	2.08
Holmes'Ribgrass	86.8%	2.05

Die Ausbeute an gereinigtem TMVP betrug je nach TMV-Stamm 74.4 - 86.8% der eingesetzten Virusmenge (Tab. 16), wobei die maximale theoretische Ausbeute bei einem RNA-Gehalt von etwa 5% (Noordam, 1973), 95% TMVP beträgt.

Abb. 6: Absorptionsspektren der isolierten Hüllproteine von 3 TMV-Stämmen



Hüllproteine der TMV-Stämme: TMVP = Hüllprotein von TMV *vulgare*, TMVP-*d* = Hüllprotein von TMV-*dahlemense*, TMVP-HR = Hüllprotein von TMV-Holmes'Ribgrass

2.2 Tryptische Peptide des Hüllproteins von TMV *vulgare* (TMVP)

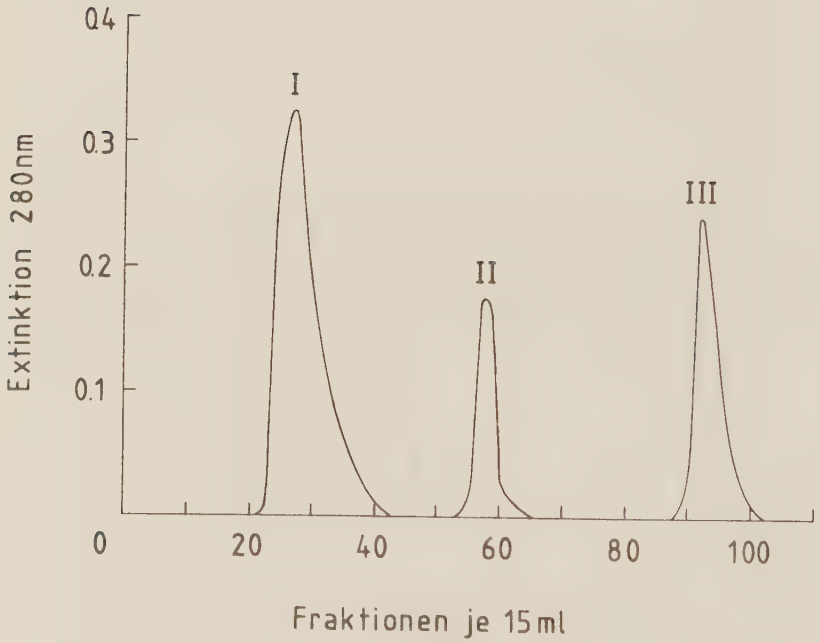
Eine gute Trennung der tryptischen Peptide (TP) 1 (Aminosäurereste 1-41) und 10 (Aminosäurereste 123-134) wurde durch Säulenchromatographie an Sephadex G 50 erreicht (Abb. 7). Das Elutionsdiagramm entsprach den Ergebnissen von Stapanov *et al.*, (1961). Das Mengenverhältnis der eluierten TP 1 und 10 betrug etwa 7:1.

Bei der Charakterisierung der beiden tryptischen Peptide von TMVP im double antibody sandwich ELISA mit Antikörpern aus Kaninchen-Antiserum gegen TMV (Tab. 3a) reagierte nur TP 1, nicht jedoch TP 10. Daraus lässt sich schliessen, dass TP 1 mindestens eine antigene Determinante beinhaltet, die an Antikörper gegen TMV bindet, wogegen TP 10 keine solche antigene Determinante zu enthalten scheint. Dies stimmt mit Resultaten von Milton & van Regenmortel (1979), sowie Altschuh & van Regenmortel (1982) überein.

Bei den löslichen tryptischen Peptiden von TMVP konnte eine Reaktivität mit dem gleichen ELISA-Verfahren nachgewiesen werden.

Die spezifische Extinktion im ELISA durch tryptische Peptide war bei deren Suspension in 0.01 M Phosphatpuffer, pH 7.2 mehr als doppelt so hoch, wie in Essigsäure oder NaOH, was vermutlich auf eine veränderte Konformation der Peptide zurückzuführen ist.

Abb. 7: Elutionsdiagramm der Trennung der tryptischen Peptide 1 und 10



Auftrennung der Peptide 1 (Peak I) und 10 (Peak II), sowie Harnstoff (Peak III) durch Gelfiltration einer konzentrierten Suspension beider Peptide in 8 M Harnstoff über eine Sephadex G50-Säule (3.5 x 135 cm) mit 0.01 N NaOH als Elutionsmittel bei 4°C

3. SEROLOGISCHE REAKTIVITÄT DES SYNTHETISIERTEN C-TERMINALEN TETRAPEPTIDS VON TMVP

Mehrere antigene Determinanten des TMV-Nukleokapsids, wie auch der Hüllprotein-Monomere (TMVP) konnten durch Untersuchungen mit polyklonalen Antikörpern festgestellt werden (Milton & van Regenmortel, 1979). Demnach enthält das C-terminale tryptische Peptid 12 (Aminosäurereste 142-158), das sowohl in den Proteinmonomeren, als auch im Nukleokapsid an der Oberfläche lokalisiert ist (Milton & van Regenmortel, 1979; Milton *et al.*, 1980), eine antigene Determinante, die vermutlich die 4 letzten Aminosäuren umfasst. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde das entsprechende Tetrapeptid H_2N-Gly-Pro-Ala-Thr-OH des Hüllproteins von TMV *vulgare* chemisch synthetisiert. Dieses Peptid diente ausserdem zur Auffindung und Charakterisierung solcher monoklonaler Antikörper, die mit der isolierten C-terminalen Aminosäuresequenz von TMVP im ELISA reagieren können.

Um das synthetisierte Tetrapeptid (STP) stärker zu exponieren und frei zugänglich zu machen, damit es als antigene Determinante erkannt werden kann, wurde es in der gleichen Orientierung, wie im nativen Protein, an polymere Träger gebunden. Dieses Verfahren wird auch bei der Immunisierung mit haptenen Gruppen zur Herstellung von Antiseren verwendet (Anderer *et al.*, 1967).

Die serologische Reaktivität der freien STP, sowie die Reaktivität von STP-Molekülen, die in unterschiedlicher Zahl an zwei verschiedene polymere Träger gebunden waren, wurde mit polyklonalen Antikörpern gegen TMV im direkten und indirekten ELISA geprüft.

Beim direkten ELISA (Tab. 3a) wurden die Peptide in einem Sandwich zwischen zwei virusspezifischen Antikörpern gebunden, beim indirekten ELISA (Tab. 3b) wurden sie an die Polystyroloberfläche der Testplatten adsorbiert und mussten nur 1x mit TMV-spezifischen Antikörpern reagieren. Anhand der Ergebnisse dieser Tests wurden die geeigneten Substanzen zum Screening von MCA, die gegen den C-terminalen Bereich von TMVP gerichtet sind, ausgewählt.

Die Reaktivität ($Ext._{405nm}$) der löslichen tryptischen Peptide des nativen TMVP, des snythetisierten Tetrapeptids (STP) und der STP-Konjugate im direkten und indirekten ELISA ist in Tab. 17 und Tab. 18 dargestellt.

Die löslichen tryptischen Peptide (LTP) von TMVP, die u.a. auch das C-terminale tryptische Peptid 12 enthalten, dessen C-terminaler Bereich dem STP entspricht, wurden als biologisch "synthetisierte" Positivkontrolle verwendet. Die LTP liessen sich in beiden Testsystemen bis zu einer Konzentration von 1×10^{-6} g/ml nachweisen. Im indirekten ELISA wurden bei gleicher Konzentration der LTP eine um den Faktor 4.2 höhere Extinktion erreicht.

Threonin, die C-terminale Aminosäure von TMVP, reagierte, vermutlich aufgrund der geringen Grösse des Moleküls, in keinem der ELISA-Systeme mit Antikörpern gegen TMV.

Das freie Tetrapeptid mit und ohne cross-linker reagierte, wahrscheinlich aus dem selben Grund, ausschliesslich im indirekten ELISA, wo nur 1x eine Bindung durch virusspezifische Antikörper notwendig ist, bei einer Konzentration von 1×10^{-4} g/ml mit Ak gegen TMV, wobei das durch den cross-linker vergrösserte Peptid eine um den Faktor 6.4 höhere Extinktion zeigte (Tab. 18).

Tabelle 17: Reaktivität ($Ext._{405nm}$) verschiedener Substanzen mit polyklonalen Antikörpern gegen TMV in einem direkten ELISA [a)]

Proben [b)]	Konzentration der Proben (g/ml)			
	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Thr	-	-	-	-
STP	-	-	-	-
STP-CL	-	-	-	-
HSA	-	-	-	-
HSA-STP_8	0.136	0.088	-	-
HSA-STP_{16}	0.262	0.090	-	-
PL -STP_{68}	>2.000	>2.000	1.674	-
PL -STP_{350}	>2.000	1.387	0.123	-
LTP	0.973	0.374	0.075	-

a) Direkter ELISA (Schema 5), entsprechend Tab. 3a; $Ext._{405nm}$ nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 37°C; Extinktionswerte < 0.025 (Fehlergrenze des Messgerätes) wurden als negative Reaktivität gewertet und mit (-) gekennzeichnet; jeder Wert stellt den Durchschnitt aus 4 Wiederholungen auf insgesamt 2 Testplatten dar und wurde durch 3 getrennte Versuchsansätze bestätigt.

b) Thr = Aminosäure Threonin
STP = synthetisiertes C-terminales Tetrapeptid H_2N-Gly-Pro-Ala-Thr-OH des Hüllproteins von TMV *vulgare* (TMVP)
STP-CL = STP mit cross-linker
HSA = Humanserumalbumin
PL = Polylysin
HSA-STP, PL-STP = Peptidkonjugate mit unterschiedlicher Zahl gekoppelter Tetrapeptide/Trägermolekül (vergl. Methoden 2.4.2.2)
LTP = lösliche tryptische Peptide von TMVP

Tabelle 18: Reaktivität ($Ext._{405nm}$) verschiedener Substanzen mit polyklonalen Antikörpern gegen TMV in einem indirekten ELISA [a]

Proben [b]	Konzentration der Proben (g/ml)					
	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Thr	-	-	-	-	-	-
STP	0.064	-	-	-	-	-
STP-CL	0.413	-	-	-	-	-
HSA	-	-	-	-	-	-
$HSA\text{-}STP_8$	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	0.104	0.044
$HSA\text{-}STP_{16}$	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	0.353
$PL\text{-}STP_{68}$	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	0.547
$PL\text{-}STP_{350}$	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	0.384
LTP	>2.000	>2.000	0.316	-	-	-

a) Indirekter ELISA, entsprechend Tab. 3b;
$Ext._{405nm}$ nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 37°C
Extinktionswerte < 0.025 (Fehlergrenze des Messgerätes) wurden als negative Reaktivität gewertet und mit (-) gekennzeichnet; jeder Wert stellt den Durchschnitt aus 8 Wiederholungen auf insgesamt 4 Testplatten dar und wurde durch 3 getrennte Versuchsansätze bestätigt.

b) Thr = Aminosäure Threonin
STP = synthetisiertes C-terminales Tetrapeptid
H_2N-Gly-Pro-Ala-Thr-OH des Hüllproteins von TMV *vulgare* (TMVP)
STP-CL = STP mit cross-linker
HSA = Humanserumalbumin
PL = Polylysin
HSA-STP, PL-STP = Peptidkonjugate mit unterschiedlicher Zahl gekoppelter Tetrapeptide/Trägermolekül (vergl. Methoden 2.4.2.2)
LTP = lösliche tryptische Peptide von TMVP

Wenn mehrere STP an einen polymeren Träger, wie Humanserumalbumin (HSA) oder Polylysin (PL) gekoppelt wurden, liess sich in beiden ELISA-Verfahren eine serologische Reaktivität nachweisen. Reines HSA (Negativkontrolle) zeigte jedoch keinerlei Reaktivität.

Im direkten ELISA (Tab. 17) lag die Nachweisbarkeitsgrenze von mit 8 bzw. 16 STP substituierten HSA bei 1×10^{-5} g/ml und war damit um den Faktor 10 geringer, als von mit 68 bzw. 350 STP substituiertem Polylysin. Das HSA-Konjugat mit der doppelten Anzahl von STP-Substituenten ($HSA\text{-}STP_{16}$) erreichte bei 1×10^{-4} g/ml einen etwa 2x so hohen Extinktionswert, wie $HSA\text{-}STP_{8}$. Im Gegensatz dazu zeigte Polylysin mit der geringeren Anzahl von 68 STP-Substituenten/Trägermolekül eine mehr als 10x so hohe $Ext._{405nm}$, wie mit 350 STP-Substituenten, was möglicherweise auf sterische Behinderungen aufgrund zu vieler STP-Moleküle zurückzuführen ist (vergl. Abb. 8, 9).

Die Peptidkonjugate konnten im indirekten ELISA etwa 1 000x mehr verdünnt werden als im direkten ELISA, um die gleiche Reaktivität zu erhalten.

Die Nachweisbarkeitsgrenze der an HSA und PL gebundenen STP im indirekten ELISA war mit 1×10^{-9} g/ml um den Faktor 10^5 niedriger, als bei freien STP (Tab. 18). Mit zunehmender Zahl von STP-Substituenten/Trägermolekül, unabhängig vom Träger, erhöhte sich die Extinktion nur bis zu einem Optimum (68 STP/Träger) und fiel bei 350 STP, wie auch beim direkten ELISA beobachtet (Tab. 17), wieder ab (Tab. 18).

Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurde die $Ext._{405nm}$ im indirekten ELISA nach verschiedenen Inkubationszeiten der einzelnen Peptidkonjugate in Abhängigkeit von der Konzentration graphisch dargestellt (Abb. 9). Bei 8 STP-Substituenten/Träger war ein linearer Anstieg der Extinktion mit zunehmender Konzentration deutlich sichtbar (Tab. 9, A). Mit zunehmender Zahl der STP-Substituenten (Abb. 9, B, C) flachten mit steigender Konzentration der Konjugate die Kurven ab. Bei 350 STP-Substituenten/Polylysin schliesslich, sank die Extinktion nach einem Maximum bei 100 ng/ml mit steigender Konzentration ab. Bei hoher Konzentration des Peptidkonjugats waren anscheinend weniger Determinanten zugänglich, vermutlich aufgrund sterischer Behinderungen bei der Bindung der virusspezifischen Antikörper und Überlagerung von STP verschiedener Trägermoleküle.

Die Reaktivität verschiedener Konzentrationen der einzelnen Peptidkonjugate im indirekten ELISA in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (Abb. 8) ergab folgende Reihenfolge: $PL\text{-}STP_{68} > PL\text{-}STP_{350} > HSA\text{-}STP_{16} > HSA\text{-}STP_{8}$.

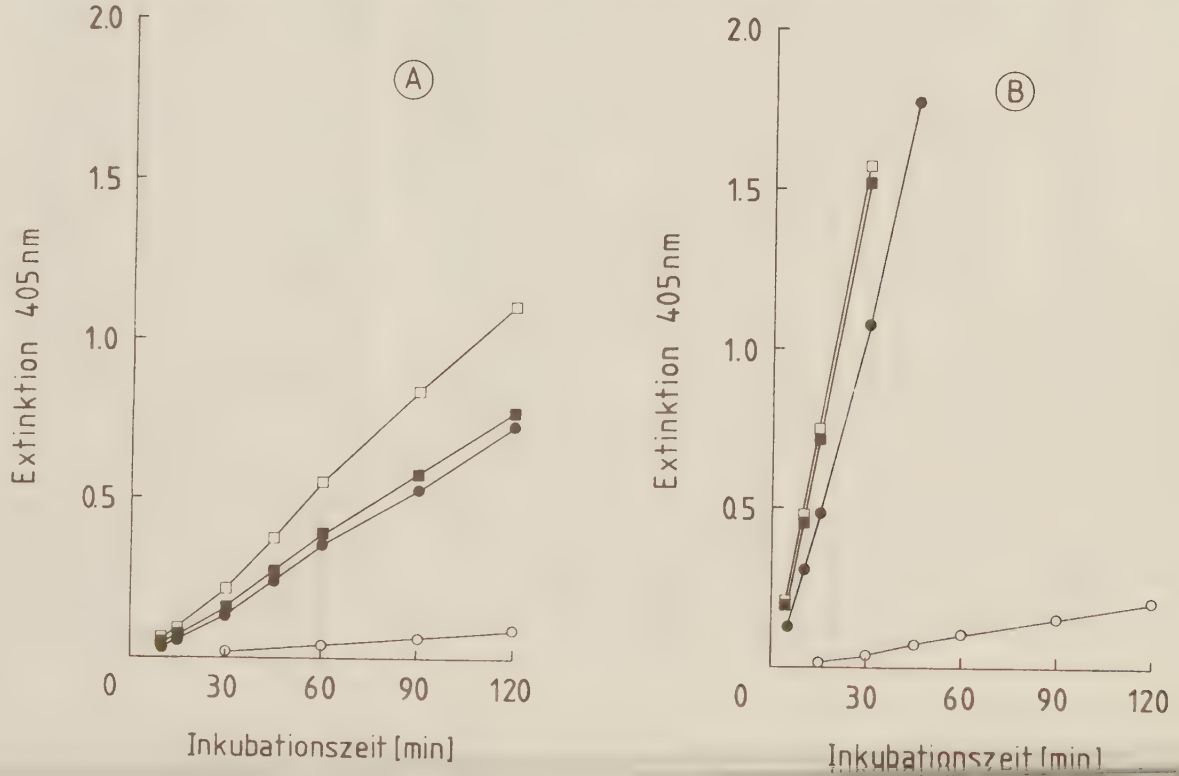
Bei geringen Konzentrationen waren die Unterschiede in der Reaktivität besonders deutlich sichtbar. So unterschieden sich bei 1 ng/ml und 60 min Inkubation bei 37°C (vergl. Tab. 18) die Konjugate mit 16 bzw. 350 STP-Substituenten nur wenig; im Vergleich damit lag jedoch die Reaktivität von $HSA\text{-}STP_{8}$ um den Faktor 8 niedriger, bzw. von $PL\text{-}STP_{68}$ um den Faktor 1.5 höher. Bei steigender Konzentration der Peptidkonjugate (Abb. 8 A-C) glichen sich mit zunehmender Extinktion die Reaktivitäten aller Konjugate an.

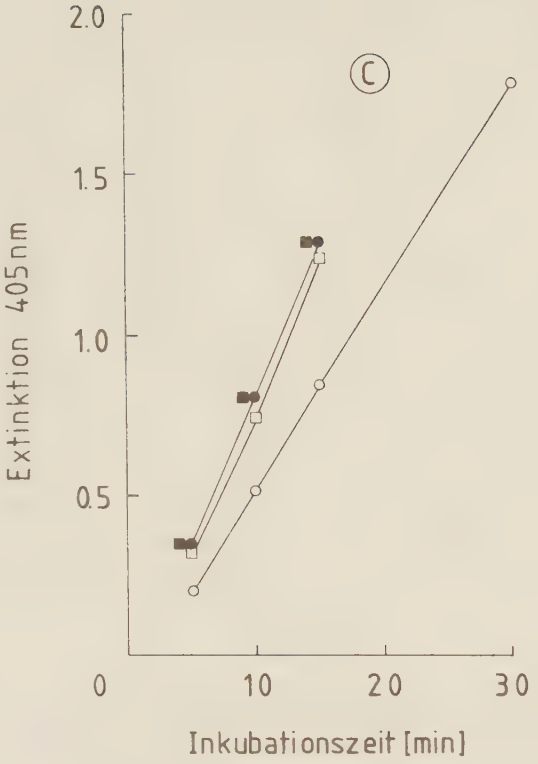
Das C-terminale Tetrapeptid H_2N-Gly-Pro-Ala-Thr-OH von TMVP stellt eine antigene Determinante von TMV dar, da es im ELISA mit Antikörpern reagiert, die nach Immunisierung eines Kaninchens mit intaktem TMV gegen diesen Bereich des Virus produziert wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die freien STP im ELISA erst bei 1×10^{-4} g/ml serologisch reaktiv waren. Wenn jedoch mehrere Peptide durch Kopplung an polymere Träger fixiert und exponiert wurden, konnte noch bei 1×10^{-9} g/ml eine Reaktivität festgestellt werden. Die Ergebnisse im direkten ELISA liegen aufgrund des double antibody sandwich jeweils niedriger als im indirekten ELISA. Wichtige Parameter für eine maximale Reaktivität war die Zahl der STP-Substituenten/Trägermolekül und die Konzentration der Konjugate. Mit höherer Substituentenzahl wurde bei geringerer Konzentration des Konjugats, unabhängig vom Träger, ein Optimum erreicht. Entscheidend war also die Gesamtzahl exponierter STP/Napf der Testplatten. Von den untersuchten Peptidkonjugaten zeigte eine Zahl von nur 8 STP-Substituenten/Trägermolekül die geringste, und 68 Substituenten die höchste Reaktivität.

Zum Auffinden von MCA, die gegen das C-terminale Tetrapeptid von TMVP gerichtet sind, wurden die Konjugate HSA-STP_{16} und PL-STP_{68} verwendet.

Abb. 8: Reaktivität verschiedener Konzentrationen von Konjugaten des synthetisierten C-terminalen Tetrapeptids von TMVP im indirekten ELISA in Abhängigkeit von der Inkubationszeit





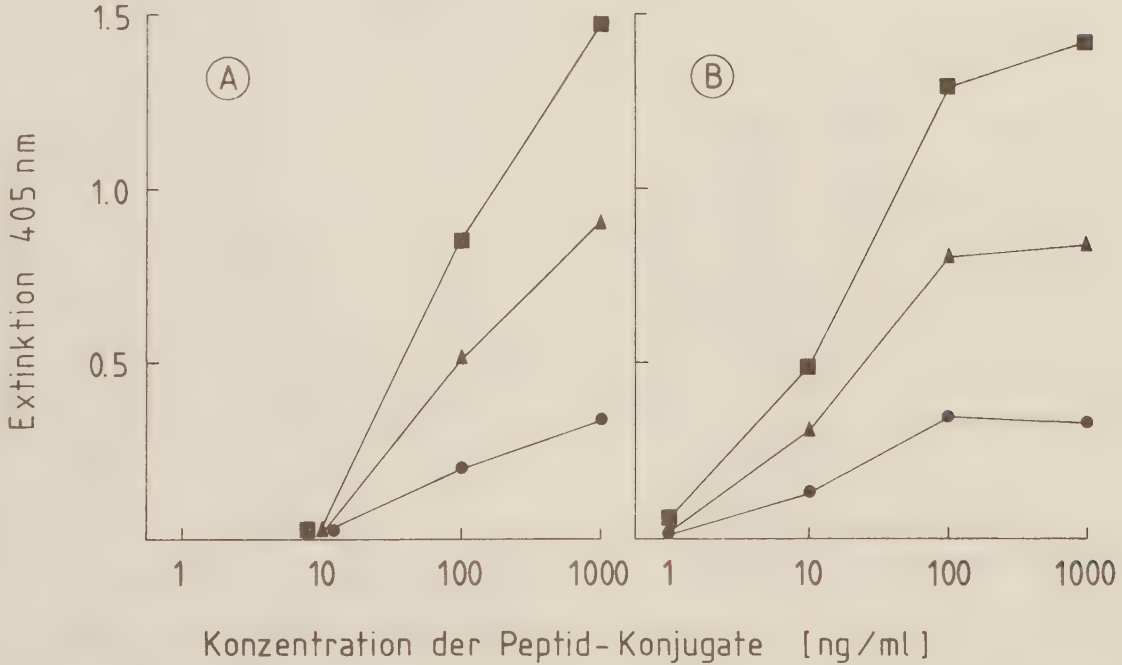
Konzentration der Peptidkonjugate zum Beschichten von Mikrotiterplatten im indirekten ELISA (Tab. 3b): (A) 1 ng/ml, (B) 10 ng/ml, (C) 100 ng/ml.
Reaktivität der Peptidkonjugate: $Ext._{405nm}$

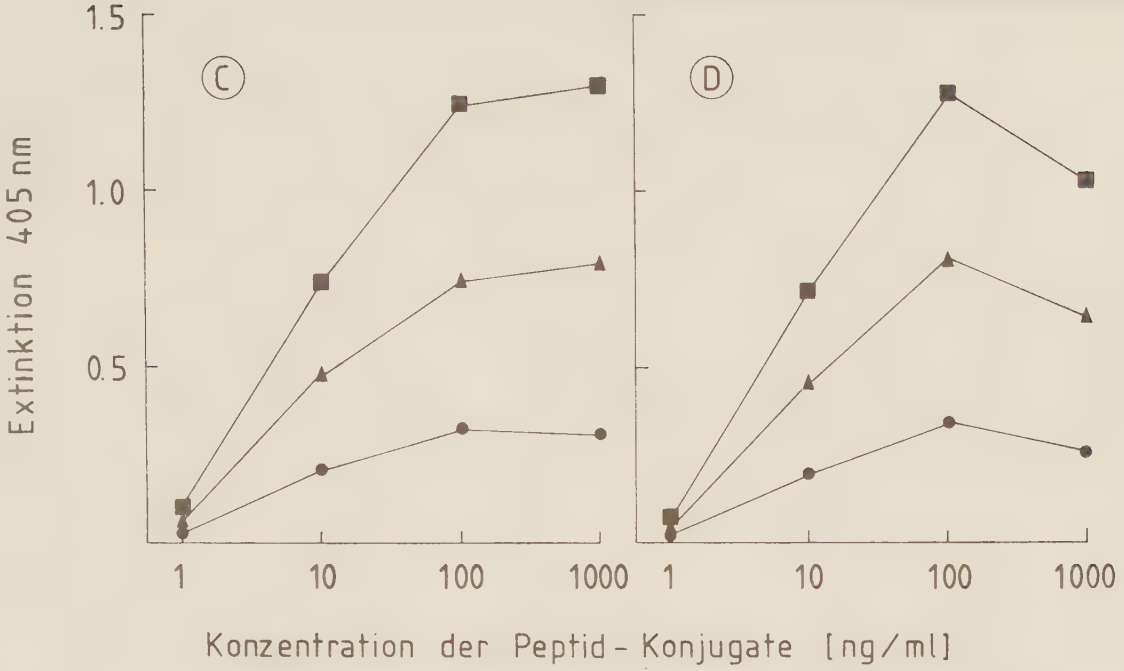
Das synthetisierte C-terminale Tetrapeptid von TMVP (STP), H_2N-Gly-Pro-Ala-Thr-OH wurde an Humanserumalbumin (HSA) und Polylysin (PL) gekoppelt, wobei unterschiedliche Anzahlen von freien Lysinresten mit dem Peptid substituiert wurden (vergl. Methoden 2.4.2.2):

(○-○) = HSA-STP_8 (□-□) = PL-STP_{68}

(●-●) = HSA-STP_{16} (■-■) = Pl-STP_{350}

Abb. 9: Reaktion von Konjugaten des synthetisierten C-terminalen Tetrapeptids von TMVP im indirekten ELISA in Abhängigkeit von der Konzentration





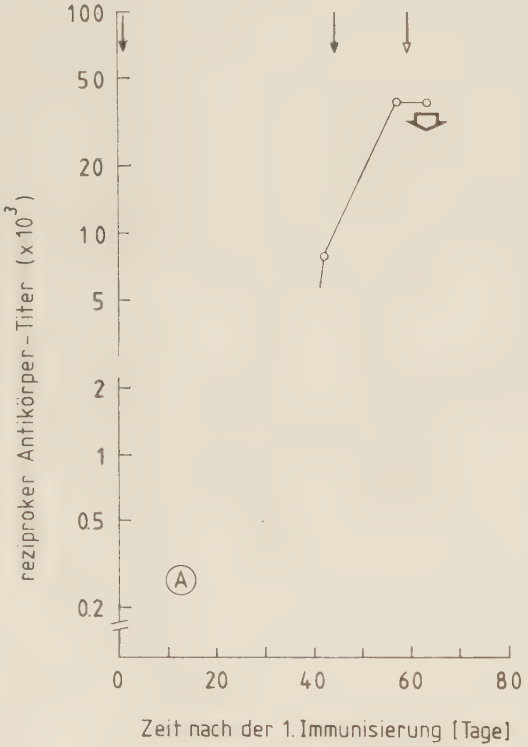
Das synthetisierte C-terminale Tetrapeptid von TMVP (STP), H_2N-Gly-Pro-Ala-Thr-OH, wurde an Humanserumalbumin (HSA) und Polylysin (PL) gekoppelt, wobei unterschiedliche Anzahlen von freien Lysinresten mit dem Peptid substituiert wurden (vergl. Methoden 2.4.2.2): (A) HSA-STP_8; (B) HSA-STP_{16}; (C) PL-STP_{68}; (D) PL-STP_{350}. Die Menge hydrolysierten Substrats im indirekten ELISA (Tab. 3b) ($Ext._{405nm}$) wurde nach einer Inkubationszeit von 5 min (●), 10 min (▲) und 15 min (■) bei 37°C gemessen.

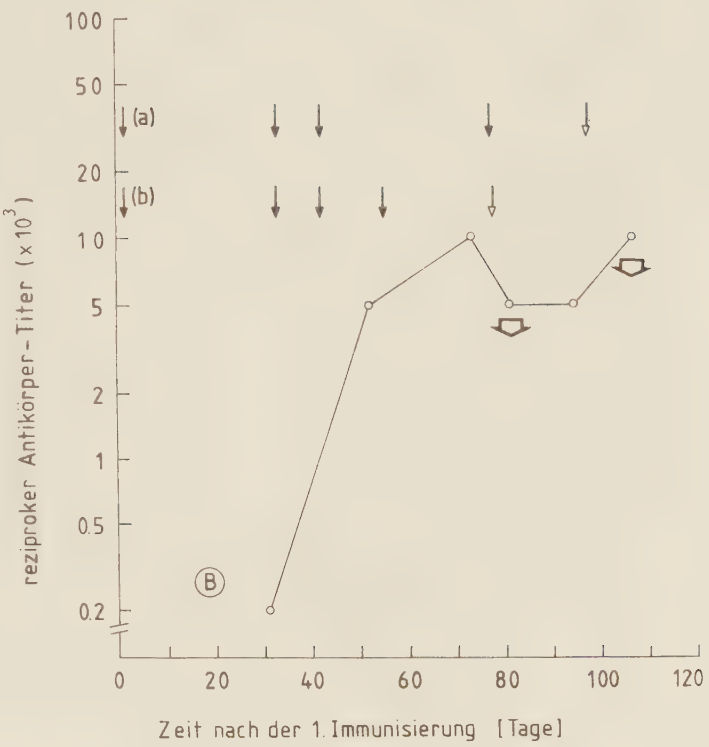
4. IMMUNISIERUNG VON MÄUSEN MIT DEN GEREINIGTEN VIREN UND BESTIMMUNG DES VIRUSSPEZIFISCHEN ANTIKÖRPER-TITERS

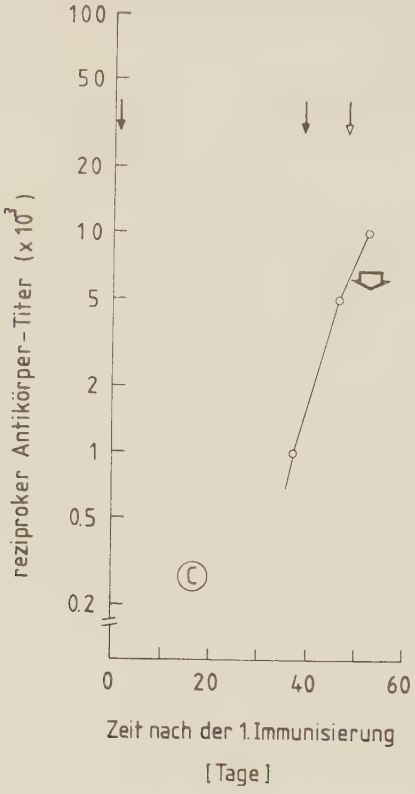
Um eine möglichst grosse Zahl von Antikörper-produzierenden Hybridomas zu erhalten, wurden für die Hybridisierung von Milzzellen die immunisierten Mäuse mit dem höchsten virusspezifischen Antikörper (Ak)-Titer im Serum ausgewählt. Die Zeitabstände zwischen den Immunisierungen orientierten sich an dem für TMV erfolgreichen Impfschema (Dietzgen & Sander, 1982). In Abb. 10 sind die Immunisierungen (vergl. Tab. 1b), sowie der resultierende Verlauf des Ak-Titers dargestellt. Die durch Immunisierung mit TMV, ArMV und PLRV erhaltenen virusspezifischen Ak-Titer sind untereinander nicht direkt vergleichbar, da unterschiedliche Virusmengen zur Immunisierung zur Verfügung standen und aufgrund der Testoptimierung zum Nachweis der jeweiligen virusspezifischen Antikörper sich zur Titerbestimmung unterschiedliche Parameter für den ELISA ergeben hatten.

TMV. Vierzehn Gruppen von 5-10 Mäusen wurden jeweils gleich immunisiert und die Tiere mit den höchsten Ak-Titern jeder Gruppe zu insgesamt 10 erfolgreichen Zellfusionen verwendet. Die injizierte Gesamtmenge hochgereinigter Virionen betrug 4-6 mg TMV/Maus. Am Tag der Zellfusion, etwa 2 Monate nach der 1. Immunisierung, wurden mit dem ELISA (Tab. 5) im Serum TMV-Ak-Titer von 1:10 000 - 1:60 000 festgestellt (Abb. 10, A).

Abb. 10: Impfschemata und virusspezifische Antikörper-Titer







Virusspezifischer Antikörper-Titer von Antiseren verschiedener Blutabnahmen von STU-Mäusen, immunisiert mit TMV-*vulgare* (A), ArMV-ATCC (B) und PLRV-CH (C), im indirekten ELISA (Tab. 5-8).
Als Antikörper-Titer wurde diejenige Verdünnung des Antiserum definiert, deren Reaktion im ELISA, nach Abzug der unspezifischen Reaktion des Normalserums, eine $Ext._{405nm} > 0.1$ ergab.

Zeichenerklärung:

↓ = subcutane Immunisierung

⇩ = intravenöse Immunisierung

⇩ = Zellfusion

ArMV. Sechs Mäuse wurden mit insgesamt 300 µg ArMV/Maus entsprechend den Impfschemata a) und b) (Abb. 10, B) immunisiert. Bis zu einem Monat nach der 1. Immunisierung konnten, wegen der geringen applizierten ArMV-Menge und der geringen immunologischen Reaktivität der Mäuse auf das Antigen, keine Antikörper gegen ArMV im Serum nachgewiesen werden. Daher konnten erst 81 bzw. 106 Tage nach der Erstimmunisierung, nach 3 weiteren subcutanen Injektionen des Virus und nach Erreichen eines ArMV-Ak-Titers (Tab. 6) von 1:10 000, 4 erfolgreiche Zellfusionen durchgeführt werden.

PLRV. Fünf Gruppen von 2-4 Mäusen wurden insgesamt 400-500 µg PLRV/Maus injiziert und etwa 2 Monate nach der 1. Immunisierung mit den Mäusen mit dem höchsten Ak-Titer 5 erfolgreiche Zellfusionen durchgeführt. Am Tag der Zellhybridisierung betrugen die mit dem ELISA bestimmten PLRV-Ak-Titer bei direkter Beschichtung der Testplatten mit PLRV (vergl. Methoden Tab. 7) 1:1 000 - 1:4 000, bei Verwendung Ak-vorbeschichteter Testplatten (Tab. 8) 1:5 000 - 1:10 000 (Abb. 10,C).

5. HERSTELLUNG, SELEKTION UND KLONIERUNG VON VIRUSSPEZIFISCHE ANTIKÖRPER-SEKRETIERENDEN HYBRIDOMA-KULTUREN

5.1 TMV-Antikörper-sekretierende Hybridomas

Bei 10 erfolgreichen Zellfusionen von Milzzellen aus TMV-hyperimmunisierten Mäusen waren nach 3-4 Wochen in durchschnittlich 83.5% (50.5-100%) der plattierten Kulturschalen Hybridomas gewachsen (Tab. 19) und in 47.4% (13.5-95.5%) der Schalen konnten mit dem ELISA (Tab. 9) TMV-Antikörper im Medium nachgewiesen werden.

Tabelle 19: Häufigkeit von anti-TMV Antikörper-sekretierenden Hybridoma-Kulturen 3-4 Wochen nach der Zellfusion

Fusion Nr.	Zahl der Milzzellen*	Zahl der Myelomzellen	Milzzellen: Myelomzellen	plattierte Kulturschalen		
				Gesamt	mit wachsenden Hybridomas	mit Ak-sekretierenden Hybridomas
1	5.3×10^7	4.0×10^7	1.3 : 1	89	45 (50.5%)	28 (30.3%)
2	6.5×10^7	5.0×10^7	1.3 : 1	89	89(100.0%)	85 (95.5%)
3	5.0×10^7	5.0×10^7	1.0 : 1	86	74 (86.0%)	59 (68.6%)
4	7.0×10^7	1.3×10^7	5.4 : 1	70	66 (94.3%)	46 (65.7%)
5	1.2×10^8	3.7×10^7	3.2 : 1	96	85 (88.5%)	53 (55.2%)
6	1.3×10^8	1.3×10^7	10.0 : 1	96	56 (58.3%)	47 (49.0%)
7	8.6×10^7	5.2×10^7	1.7 : 1	96	94 (97.9%)	13 (13.5%)
8	1.5×10^8	8.0×10^7	1.9 : 1	120	120(100.0%)	23 (19.2%)
9	3.2×10^7	3.2×10^7	1.0 : 1	72	72(100.0%)	34 (47.2%)
10	1.1×10^8	6.0×10^7	1.8 : 1	144	85 (59.0%)	40 (27.8%)

* Zahl der Milzzellen von TMV-hyperimmunisierten STU-Mäusen

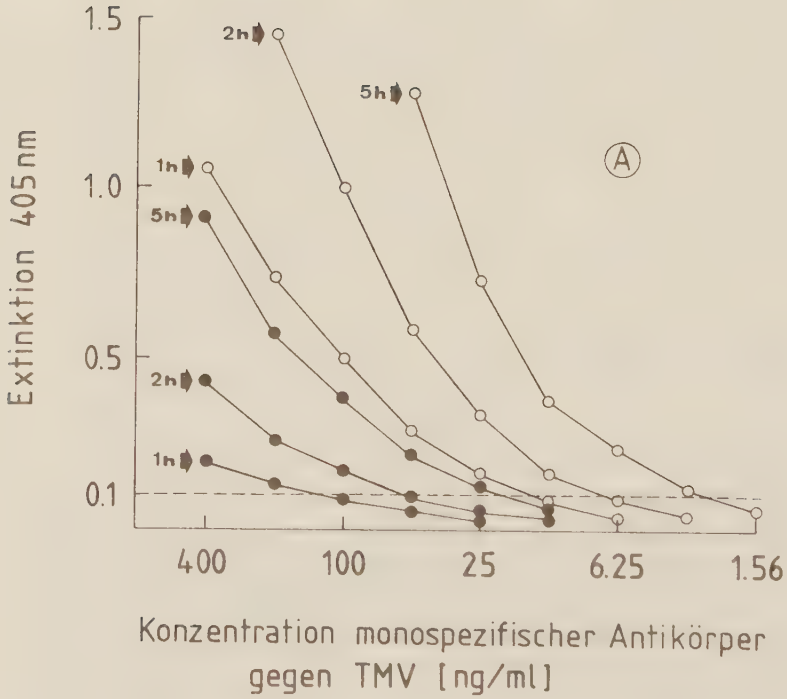
Von den wachsenden Hybridomas sekretierten durchschnittlich 54.5% (13.5-95.5%) Antikörper, die mit dem TMV-Nukleokapsid und/oder den TMV-Proteinmonomeren reagierten.

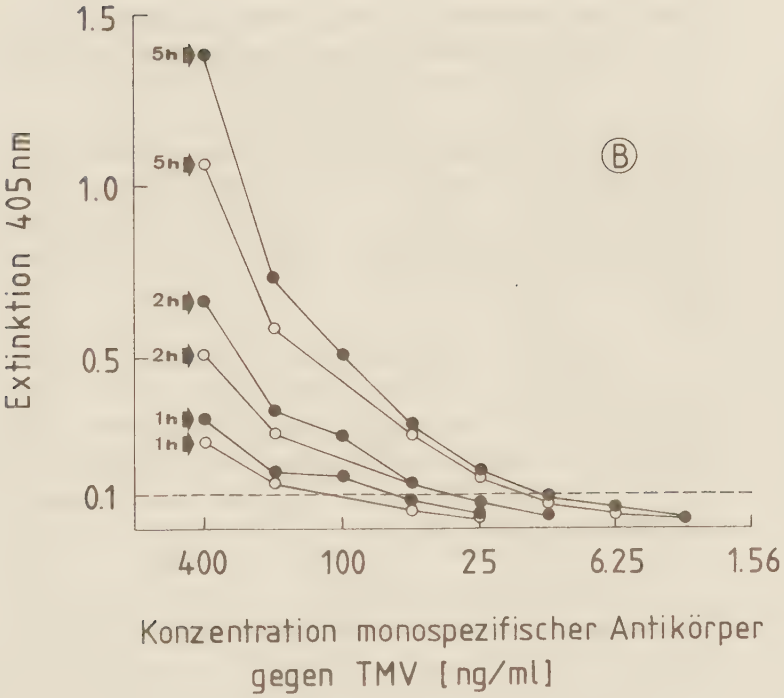
In Abhängigkeit von der Menge und dem physiologischen Zustand der fusionskompetenten Myelom- und Milzzellen, dem Anteil TMV-Ak-sekretierender Plasmazellen in der Milz zum Zeitpunkt der Zellfusion, und der Gesamtzellzahl bei der Fusion, schwankte die Zahl wachsender, wie auch Antikörper-sekretierender Hybridoma-Kulturen zwischen den verschiedenen Fusionen um 50-80% (Tab. 19). Dabei konnte keinem speziellen Verhältnis von Milzzellen zu Myelomzellen bei der Zellfusion der Vorzug gegeben werden.

Der Prozentsatz spezifischer Ak-sekretierender Hybridoma-Kulturen war nach der Zellfusion bei TMV (54.5%) um den Faktor 3-5 höher, als bei ArMV (11.6%) und PLRV (18.4%) (vergl. 5.2 und 5.3).

Von 159 untersuchten Hybridoma-Kulturüberständen enthielten 3-4 Wochen nach den Zellfusionen 41.5% Antikörper, die im ELISA (Tab. 9) ausschliesslich mit TMV-Proteinmonomeren (TMVP), nicht aber mit dem TMV-Nukleokapsid (TMV) reagierten, 35.9% Antikörper, die ausschliesslich mit dem TMV-Nukleokapsid, nicht aber mit den TMV-Proteinmonomeren, und 22.6% Antikörper, die sowohl mit dem TMV-Nukleokapsid als auch mit den TMV-Proteinmonomeren reagierten. Die zu diesem Zeitpunkt innerhalb einer Woche ins Kulturmedium sekretierten Antikörpermengen wurden anhand einer Eichkurve geschätzt. Die Eichkurve wurde anhand einer Verdünnungsreihe von monospezifischen, polyklonalen Antikörpern gegen TMV (vergl. Methoden 2.6) in Kulturmedium im ELISA (Tab. 9) erstellt; die Testplatten waren mit TMV bzw. TMV-Proteinmonomeren (TMVP) in den während der Optimierung der Testparameter verwendeten Konzentrationen beschichtet.

Abb. 11: Nachweis monospezifischer, polyklonaler Antikörper gegen TMV mit dem ELISA bei unterschiedlicher Beschichtung der Testplatten-I





Der ELISA wurde entsprechend Tab. 9 durchgeführt. Mikroelisa-Platten wurden beschichtet mit: TMV (A): 10 µg/ml (o-o); 1 µg/ml (●-●); TMV-Proteinmonomeren (B): 50 µg/ml (o-o); 10 µg/ml (●-●).
Die monospezifischen Ak gegen TMV wurden in Kulturmedium in 2er-Schritten verdünnt. Die $Ext._{405nm}$ wurde nach 1, 2 und 5 h Substratinkubation gemessen. Jeder Wert stellt den Durchschnitt aus 12 Wiederholungen aus zwei getrennten Testansätzen dar. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den gewählten Grenzwert für eine positive Reaktion zur Bestimmung der Nachweisbarkeitsgrenze der TMV-spezifischen Antikörper (Tab. 20).

Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurde die $Ext._{405nm}$ in Abhängigkeit von der Konzentration der monospezifischen Antikörper aufgezeichnet (Abb. 11). Entsprechend den, beim jeweiligen Nachweis von Ak gegen TMV bzw. TMVP in den Kulturüberständen verwendeten Testparametern, wurde die zutreffende Eichkurve ausgewählt und die der gemessenen Extinktion entsprechende Konzentration TMV-spezifischer Antikörper ermittelt.

Die im ELISA gemessenen Extinktionswerte der Kulturüberstände nach der Zellfusion, von 0.05-0.70 entsprachen dabei einer geschätzten Antikörperkonzentration von 20-250 ng/ml, je nach Zelldichte und dem Anteil TMV-Ak-sekretierender Hybridomas in den verschiedenen Kulturschalen.

Die Nachweisbarkeitsgrenze der monospezifischen Antikörper gegen TMV im ELISA mit den Parametern zum Ak-Nachweis in Kulturüberständen (Tab. 9) lag bei einem gewählten Grenzwert von 0.1 $Ext._{405nm}$ (Abb. 11) und einer Inkubationszeit von 5 h bei 37°C bei 3-25 ng Ak/ml (Tab. 20).

Die geringsten Ak-Konzentrationen konnten durch Beschichten mit 10 µg TMV/ml (Tab. 20, Abb. 11) bzw. 10 µg TMVP/ml (Abb. 11) nachgewiesen werden. Um die höchst mögliche Testempfindlichkeit zu erreichen, wurden diese Beschichtungs-Konzentrationen seither bei diesem Testsystem eingesetzt.

Tabelle 20: Nachweisbarkeitsgrenze von monospezifischen polyklonalen Antikörpern gegen TMV im ELISA[a)]

Virale Antigene[b)]	Konzentration beim Coating (µg/ml)	Nachweisbarkeitsgrenze (ng Ak/ml)		
		1 h[c)]	2 h[c)]	5 h[c)]
TMV	10	25	6	3
TMV	1	200	100	25
TMVP	50	100	50	25
TMVP	10	100	50	25

a) ELISA entsprechend Tab. 9; als Grenzwert für eine positive Reaktion wurde $Ext._{405nm}$ = 0.1 gewählt (Abb. 11)

b) TMV = TMV-Nukleokapsid; TMVP = TMV-Proteinmonomer

c) Inkubationszeiten des Substrats bei 37°C

Nach mehreren Subklonierungen erhöhte sich, mit zunehmender Stabilität der Hybridomalinien, der Prozentsatz TMV-Ak-sekretierender Hybridomas an den gewachsenen Hybridoma-Kulturen von 40% nach der ersten Klonierung auf 60-100% nach weiteren Klonierungen. Die von Hybridoma-Klonen sekretierten Ak-Mengen in 1-2 ml-Kulturen betrugen 40-400 ng/ml Kulturüberstand. Dies entspricht 1.6 - 16 x 10^{11} IgG-Molekülen/ml Kulturüberstand (MG_{IgG} = 1.5 x 10^5 d).

In einem ersten Versuch wurden durch zweimalige limiting dilution Klonierung und Selektion 8 Klone erhalten. Die von 5 dieser Klone in einer Konzentration von schätzungsweise 10-50 ng/ml Kulturmedium (Abb. 11) sekretierten monoklonalen Antikörper (MCA) reagierten ausschliesslich mit dem TMV-Nukleokapsid und die MCA der 3 anderen Klone (25-200 ng/ml) ausschliesslich mit den TMV-Proteinmonomeren (Dietzgen & Sander, 1982). Die Klone unterschieden sich in ihrer Effizienz, Antikörper zu sekretieren bis zu einem Faktor von 5 (Tab. 21).

Tabelle 21: Antigen-Spezifität und Effizienz der Produktion monoklonaler Antikörper gegen TMV bei verschiedenen Hybridoma-Klonen

Hybridoma-Klon	Antigen-Spezifität im ELISA[a)]		Effizienz der Ak-Produktion[b)] ($Ext._{405nm}$)
	TMV-Nukleokapsid	TMV-Protein-monomer	
1	+	-	0.195
2	+	-	0.050
3	+	-	0.086
4	+	-	0.104
5	+	-	0.262
6	-	+	0.059
7	-	+	0.112
8	-	+	0.168

a) ELISA entsprechend Tab. 9

b) Messung der Menge hydrolysierten Substrats nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C

Bei weiteren Zellfusionen wurden neben TMV- bzw. TMVP-spezifischen Klonen auch solche isoliert, die MCA sekretierten, die sowohl mit TMV als auch mit TMVP reagierten.

Von 129 TMV/TMVP-Ak-sekretierenden Hybridoma-Klonen reagierten die Kulturüberstände von 20-40 ml Flaschenkulturen im ELISA (Tab. 9): 78.3% mit TMV und TMVP, 11.6% ausschliesslich mit TMVP und 9.3% ausschliesslich mit TMV. Die Ausbeute an sekretierten MCA lag im frühen Stadium von Massenkulturen (20-1 300 ml/Klon) bei 20-300 ng/ml Kulturüberstand.

Wie sich später herausstellte, liegen die anhand der Eichkurven geschätzten Konzentrationen wahrscheinlich um den Faktor 100-1 000 zu niedrig (vergl. Ergebnisse 7.2).

5.2 ArMV-Antikörper-sekretierende Hybridomas

Bei der somatischen Hybridisierung von Myelomzellen mit Milzzellen aus ArMV-hyperimmunisierten Mäusen waren nach 3-4 Wochen von den plattierten Kulturschalen aus 4 Fusionen durchschnittlich 28.3% (11.3-53.0%) mit Hybridomas bewachsen und in 3.3% der Schalen konnten mit dem ELISA (Tab. 9) ArMV-Ak im Medium nachgewiesen werden (Tab. 22). Der Anteil von Hybridomas, die Antikörper sekretierten welche mit ArMV reagierten, an der Gesamtzahl wachsender Hybridomas, betrug 11.6%

Ausgehend von verschiedenen ArMV-Ak-sekretierenden Kulturen wurden durch limiting dilution Klonierungen, anschliessende Expansion der Klone und Überprüfung der serologischen Reaktivität im ELISA, 62 ArMV-Ak-sekretierende Hybridoma-Klone isoliert. Dabei erhöhte sich der Prozentsatz ArMV-Ak-sekretierender Hybridomas an der Menge wachsender Hybridomas nach den Subklonierungen von 20% auf 70-75%.

Tabelle 22: Häufigkeit von anti-ArMV Antikörper-sekretierenden Hybridoma-Kulturen 3-4 Wochen nach der Zellfusion

Fusion Nr.	Zahl der Milzzellen*	Zahl der Myelomzellen	Milzzellen : Myelomzellen	plattierte Kulturschalen		
				Gesamt	mit wachsenden Hybridomas	mit Ak-sekretierenden Hybridomas
1	1.55×10^8	4.6×10^7	3.4 : 1	168	19 (11.3%)	1 (0.6%)
2	1.70×10^8	5.0×10^7	3.4 : 1	168	35 (20.8%)	10 (6.0%)
3	8.00×10^7	6.0×10^7	1.3 : 1	168	47 (28.0%)	1 (0.6%)
4	8.75×10^7	5.0×10^7	1.8 : 1	168	89 (53.0%)	10 (6.0%)

* Zahl der Milzzellen von ArMV-hyperimmunisierten STU-Mäusen

5.3 PLRV-Antikörper-sekretierende Hybridomas

Bei 5 erfolgreichen Zellfusionen von Milzzellen aus PLRV-hyperimmunisierten Mäusen waren nach 3-4 Wochen in durchschnittlich 95.4% der plattierten Kulturschalen Hybridomas gewachsen und in 17.5% der Schalen waren PLRV-Ak-sekretierende Hybridomas nachweisbar (Tab. 23). Die PLRV-Ak enthaltenden Kulturüberstände führten im ELISA (Tab. 10) zu Extinktionswerten zwischen 0.05 und 0.25. Von der Gesamtzahl wachsender Hybridomas sekretierten 18.4% Antikörper gegen PLRV.

Durch limiting dilution Klonierungen verschiedener PLRV-Ak-sekretierender Hybridoma-Kulturen aus 3 Zellfusionen konnten insgesamt 99 einzelne Klone (2-5% der plattierten Klonierungsnäpfchen) isoliert werden.

Eine Vermehrung der Klone und nähere Charakterisierung der sekretierten Antikörper war jedoch leider nicht möglich. Poly- und monoklonale Hybridoma-Kulturen zeigten starke Instabilität und stellten vielfach nach einer gewissen Zeit ihr Wachstum ein. Zusätzlich wurde ein Grossteil der Hybridomas durch einen technischen Defekt am Brutschrank in einer kritischen Versuchsphase, in der noch keine Zellen eingefroren werden konnten, zerstört.

Durch Fusion von Milzzellen aus PLRV-hyperimmunisierten Mäusen konnten somit im Rahmen dieser Arbeit keine stabilen PLRV-Ak-sekretierenden Hybridoma-Klone erhalten werden.

Tabelle 23: Häufigkeit von anti-PLRV Antikörper-sekretierenden Hybridoma-Kulturen 3-4 Wochen nach der Zellfusion

Fusion Nr.	Zahl der Milzzellen*	Zahl der Myelomzellen	Milzzellen : Myelomzellen	plattierte Kulturschalen		
				Gesamt	mit wachsenden Hybridomas	mit Ak-sekretierenden Hybridomas
1	1.25×10^8	4.0×10^7	3.1 : 1	112	112 (100%)	22 (19.7%)
2	1.25×10^8	1.0×10^8	1.25 : 1	120	120 (100%)	17 (14.2%)
3	1.75×10^8	5.0×10^7	3.5 : 1	144	128 (88.9%)	8 (5.6%)
4	1.50×10^8	5.0×10^7	3.0 : 1	144	131 (90.9%)	25 (17.4%)
5	2.80×10^8	2.8×10^7	10.0 : 1	144	140 (97.2%)	44 (30.5%)

* Zahl der Milzzellen von PLRV-hyperimmunisierten STU-Mäusen

6. ANREICHERUNG UND REINIGUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER

Die Kulturüberstände von Hybridoma-Klonen enthalten neben den sekretierten monoklonalen Antikörpern (Maus), durch die Zugabe von 10-20% des wachstumsfördernden fötalen Kälberserums (FCS) zum Kulturmedium, eine Vielzahl weiterer Proteine in Konzentrationen von 3.8 - 7.6 mg/ml (Paesel, HY-Clone, Nr. 165c), darunter auch eine unbekannte Menge IgG vom Kalb.

Durch Affinitäts-Chromatographie an Protein A - Sepharose wurden diese kontaminierenden Proteine entfernt und monoklonale Antikörper (MCA) in grosser Reinheit, jedoch nicht ohne geringe Verunreinigungen durch IgG aus dem FCS, erhalten (Goding, 1980).

Um bei Kulturüberständen von mehr als 100 ml das Volumen zu verringern und die Proteine anzureichern, wurden sie präzipitiert. Die Fällung wurde mit 20% Polyethylenglykol (PEG) 6 000 bzw. 50% $(NH_4)_2SO_4$ bewirkt und parallel mit Antiserum gegen TMV (vom Kaninchen) durchgeführt. Die gefällten Proteine wurden sedimentiert, in H_2O bidest resuspendiert, gegen H_2O bidest dialysiert und die Proteinkonzentrationen (Bradford, 1976), sowie der TMV-Ak-Titer mit dem ELISA bestimmt (Tab. 24). Die Fällung von Proteinen mit 50% $(NH_4)_2SO_4$ erwies sich gegenüber der mit 20% PEG als überlegen, da dadurch 1.7x mehr Proteine gefällt wurden und die spezifische TMV-Ak-Aktivität 35x höher war, als bei Fällung mit PEG (Tab. 24).

Tabelle 24: Aktivität von Proteinen nach Fällung aus Antiserum gegen TMV

Fällung mit	Gefälltes Protein[a] (% des Gesamtproteins)	TMV-Ak-Aktivität[b] ($Ext._{405nm}$/µg gefälltes Protein)
20% PEG	51	0.074
50% $(NH_4)_2SO_4$	88	2.600

a) Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford (1976)

b) $Ext._{405nm}$ im ELISA (Tab. 11) nach 2 h Substratinkubation x Verdünnungsfaktor der gefällten Proteine bei dieser Extinktion/gefällte Proteinmenge

Da durch die Fällung mit 50% Ammoniumsulfat aus Antiserum die höchste Menge von Antikörpern in nativer, funktionstüchtiger Konformation erhalten wurde , wurde diese Methode auch zur Fällung der Globuline aus Hybridoma-Kulturüberständen verwendet (Schreier *et al.*, 1980; Jonak, 1980), wobei 70% des Proteins der Kulturüberstände nach der Fällung im Oberstand verblieben und keine nachweisbaren Antikörper-Mengen (ELISA, Tab. 11) enthielten.

Die Konzentration von MCA und gefällten Proteinen wurde spektrophotometrisch berechnet ($Ext._{280nm}$ 1.4 = 1.0 mg Ak/ml; Schreier *et al.*, 1980). Dabei handelt es sich lediglich um eine Schätzung der Konzentration, da die gereinigten MCA noch durch bovine IgG aus dem FCS verunreinigt sind (Goding, 1980) und die aus den Hybridoma-Kulturüberständen gefällten Proteine nur zum Teil aus Antikörper-Molekülen bestehen.

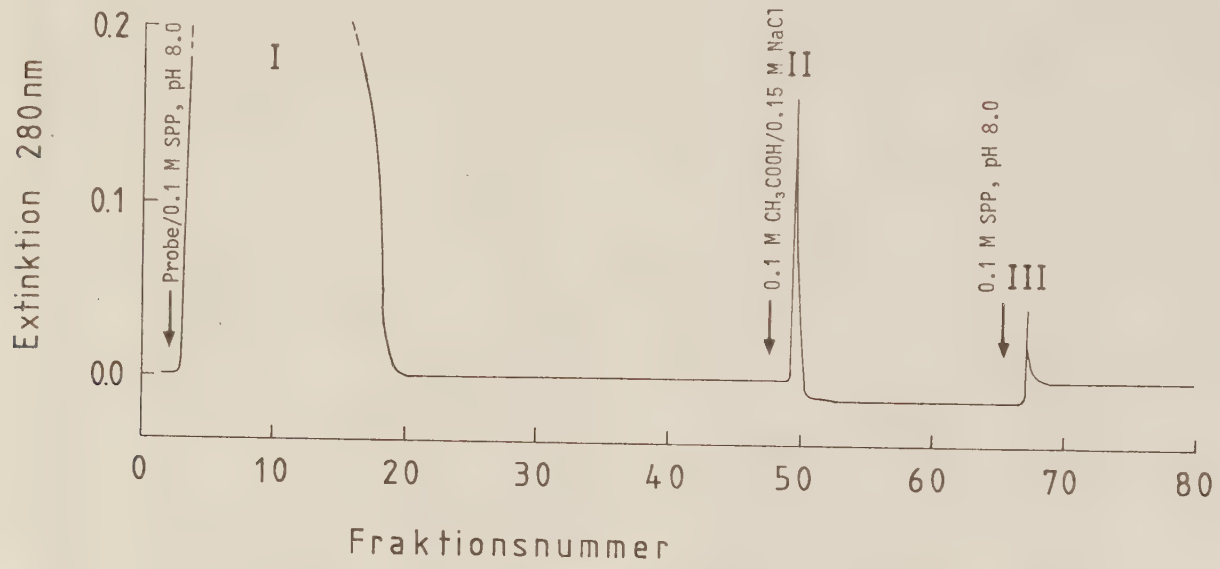
Aus 66 ArMV-Ak-enthaltenden Kulturüberständen wurden 1.20 mg ± 0.7 mg Protein/ml bei Fällung innerhalb von 2 Wochen nach der Isolierung der Kulturüberstände, d.h. nach Entfernen der Zellen, erhalten.

Aus 119 TMV/TMVP-Ak-enthaltenden Kulturüberständen wurden 1.07 ± 0.087 mg Protein/ml gefällt, wobei aus 91 Kulturüberständen, die 2-3 Monate bei 4°C gelagert worden waren, durchschnittlich 1.043 ± 0.048 mg Protein/ml Kulturüberstand, jedoch aus 28 innerhalb von 2-3 Wochen gefällten Kulturüberständen durchschnittlich 1.17 ± 0.11 mg Protein/ml erhalten wurden.

Bei baldiger Fällung treten geringfügig höhere Konzentrationen an isolierten Proteinen/ml Kulturüberstand auf. Dies deutet auf einen Verlust von Protein bei längerer Lagerung der Kulturüberstände bei 4°C hin, vermutlich durch Denaturierung und enzymatische Spaltungen durch im Medium enthaltene Serumkomponenten, die eventuell auch die Ak-Aktivität zerstören (Jonak, 1980).

Kulturüberstände mit Volumina von 20-100 ml wurden meist direkt, grössere Volumina erst nach Anreicherung der Globuline durch Fällung mit Ammoniumsulfat, durch Affinitäts-Chromatographie an Protein A - Sepharose gereinigt. Ein typisches Elutionsprofil ist in Abb. 12 dargestellt. Der Ausschlusspeak (Peak I) enthält die nicht an Protein A gebundenen Proteine (99% des Gesamtproteins) (Tab. 25). Die gesamten an Protein A gebundenen IgG-Moleküle (Peak II), die alle der IgG_{2a}-Klasse angehören (vergl. 7.1), und daher bei pH 4.5-5.0 eluierten (Ey *et al* ., 1978), stellten 0.1-1% der aufgetragenen, gefällten Proteine dar.

Abb. 12: Elutionsdiagramm der Reinigung monoklonaler Antikörper durch Affinitäts-Chromatographie an Protein A-Sepharose



Affinitäts-Chromatographie gefällter Proteine des Kulturüberstandes eines Hybridoma-Klons über eine Protein A - Sepharose-Säule (7.5 x 0.9 cm) (Methoden 2.10.2)
SPP = Sörensen-Phosphatpuffer; I : Ausschlusspeak, II : Monoklonale Antikörper

Tabelle 25: Charakterisierung der eluierten Peaks bei der Reinigung von MCA gegen TMV durch Affinitäts-Chromatographie an Protein A - Sepharose

Peak Nr.[a)]	pH-Wert	Anteil am gefällten Protein (%)[c)]	Ak-Aktivität[b)] (ELISA)
I	8.0	99.0	negativ
II	4.2-5.8	0.1-1.0	positiv
III	4.7-5.4	0.02-0.1	negativ

a) Peaks entsprechend Abb. 12

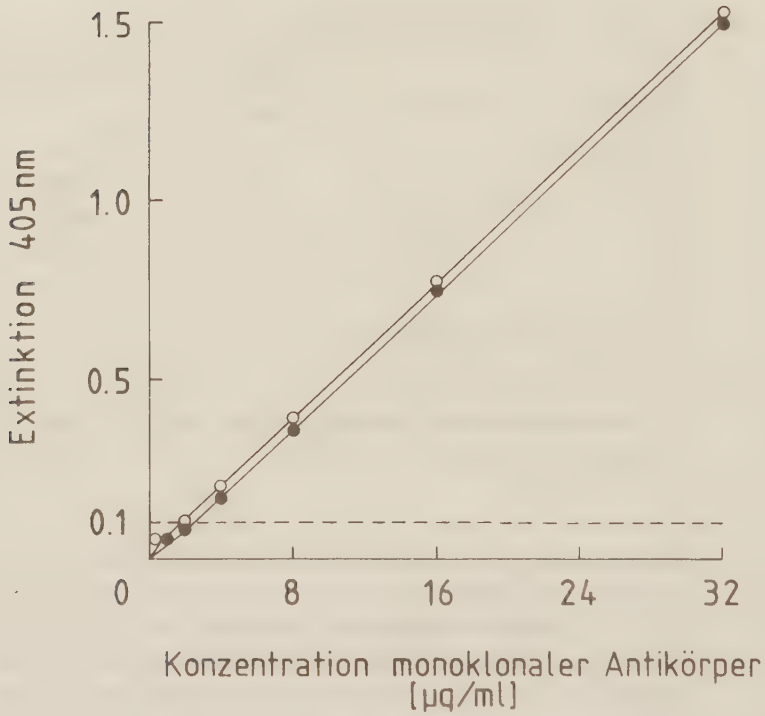
b) ELISA entsprechend Tab. 11

c) Proteinkonzentration errechnet anhand des Extinktionskoeffizienten (Schreier *et al.*, 1980).

Die während der Elution mit Essigsäure abgesunkene Basislinie (Abb. 12) stieg, nach Zugabe von 0.1 M SPP, pH 8.0, wieder auf das vorige Niveau an. Die dabei eluierten Proteine (Peak III; 0.02-0.1% des Gesamtproteins) enthalten, wie auch die Proteine des Peak I, in Konzentrationen bis zu 100 µg/ml keine im ELISA (Tab. 11) nachweisbaren Mengen an virusspezifischen Antikörpern. Die gereinigten monoklonalen Antikörper waren in Peak II enthalten und zeigten im ELISA eine deutliche Ak-Aktivität (Abb. 13).

Die monoklonalen Antikörper des Hybridoma-Klons TMV-95 liessen sich im indirekten ELISA (Tab. 11) nach Reinigung durch Affinitäts-Chromatographie an Protein A - Sepharose bei einem Grenzwert für eine positive Reaktion von 0.1 $Ext._{405nm}$ noch bis zu 2 µg/ml nachweisen (Abb. 13).

Abb. 13: Reaktivität eines gereinigten monoklonalen Antikörpers gegen TMV im indirekten ELISA



Der ELISA wurde entsprechend Tab. 11 durchgeführt. Die Mikroelisa-Platten wurden beschichtet mit 10 µg TMV/ml (○-○) bzw. 10 µg TMVP/ml (●-●). Die gereinigten MCA des Hybridoma-Klons TMV-95 (vergl. Abb. 12, Peak II) wurden in Probenpuffer verdünnt. Die $Ext._{405nm}$ wurde nach 2 h Substratinkubation bei 37°C gemessen. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Grenzwert für eine positive Reaktion zur Bestimmung der Nachweisbarkeitsgrenze des MCA.

Die Reaktivität mit dem TMV-Nukleokapsid lag um den Faktor 1.1 höher als mit den TMV-Proteinmonomeren (vergl. 7.3).

Als Kontrollexperiment wurden die Proteine aus Kulturüberständen der zur Zellhybridisierung verwendeten Myelomzellinie NS-1 ebenfalls mit Ammoniumsulfat gefällt und durch Affinitäts-Chromatographie an Protein A - Sepharose gereinigt. Auch hierbei ergaben sich 3 Peaks (Abb. 12), die jedoch alle im ELISA (Tab. 11) negativ waren, wobei Peak II vermutlich die IgG des FCS enthält.

Zum Vergleich der Ergebnisse von direkt auf eine Protein A - Sepharose-Säule aufgetragenen Kulturüberständen und zuvor durch Fällung angereicherten Globulinen, wurden die Kulturüberstände von 6 Hybridoma-Klonen, die MCA gegen TMV sekretierten, geteilt und die MCA nach beiden Methoden isoliert. Der Anteil gereinigter MCA an der auf die Säule aufgetragenen Proteinmenge wurde durch die vorherige Fällung der Globuline mit Ammoniumsulfat um den Faktor 3-6 angereichert, da ein Teil der unerwünschten Proteine schon mit dem Überstand der Fällung verworfen wurde. Anhand der Ausbeute an gereinigten MCA/ml Kulturüberstand konnte kein eindeutiger Vorteil für eine der Methoden festgestellt werden, da von den 6 Parallelversuchen 4x die zuvor angereicherten und 2x die direkt verwendeten Kulturüberstände eine höhere MCA-Ausbeute erbrachten. Die Reaktivität der so oder so gereinigten MCA mit TMV bzw. TMVP im ELISA (Tab. 11) unterschied sich nicht.

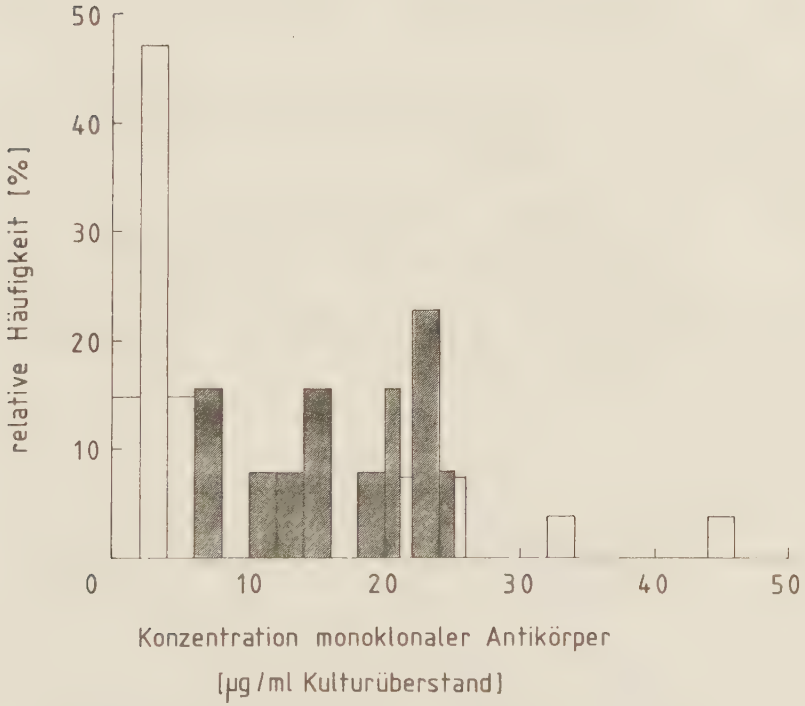
Aus Hybridoma-Massenkulturen mit 500-1 000 ml Kulturüberstand und 1-3 x 10^5 Hybridomas/ml wurden durch Fällung mit Ammoniumsulfat 0.6 - 1.1 mg Globuline/ml isoliert.

Die Schwankung der Proteinkonzentration erklärt sich aus dem unterschiedlichen Anteil von DMEM + 10-20% FCS und DMEM ohne Serum (vergl. Methoden 2.10). Nach der Dialyse wurden die MCA aus den 50-170 ml angereicherten Globulinen durch Affinitäts-Chromatographie an einer Protein A - Sepharose-Säule gereinigt. Dabei konnten aus Standkulturen 0.5 - 2.0 mg MCA gegen TMV und aus Rollerkulturen etwa die doppelte Menge, 2-4 mg MCA gegen TMV, isoliert werden. Das Verhältnis der Proteinmengen der eluierten Peaks I-III der Protein A -Sepharose-Säule (Abb. 12) von Rollerkulturen betrug: 99.5%/0.45%/0.05% und entspricht damit den in Tab. 25 angegebenen Werten. Die sekretierten MCA im Kulturüberstand von Standkulturen erreichten 0.55-3 µg/ml und in Rollerkulturen 2.9-4.3 µg/ml.

Anhand der Konzentration von 40 gereinigten MCA gegen TMV und des Volumens der zur Reinigung verwendeten Kulturüberstände wurde die Konzentration der MCA in Hybridoma-Kulturüberständen errechnet. Die MCA-Konzentration in Kulturüberständen lag bei 1-46 µg/ml mit einer Häufung bei 1-8 µg/ml und 10-26 µg/ml (Abb. 14).

Die meisten gefällten Hybridoma-Massenkulturen (>500 ml) zeigten, bezogen auf das Medienvolumen, nur geringe MCA-Konzentrationen (1-6 µg/ml), was möglicherweise auf die Zugabe eines zu grossen Volumens von Serum-freiem Medium, kurz vor der Ernte zurückzuführen ist. Bei geringeren Volumina von 20-150 ml, die, ohne Zugabe von Serum-freiem Medium 3 Tage vor der Ernte, entweder direkt oder nach Anreicherung der Globuline gereinigt wurden, scheint ein besseres Verhältnis von sekretierenden Zellen und sekretierten MCA zum Medienvolumen gegeben zu sein.

Abb. 14: Histogramm der Konzentration von monoklonalen Antikörpern (MCA) in Kulturüberständen von Hybridomas



Die Konzentration von 40 MCA gegen TMV in Kulturüberständen von Hybridoma-Massenkulturen wurde nach Affinitäts-Chromatographie an einer Protein A - Sepharose-Säule anhand des Extinktionskoeffizienten berechnet und in Bereiche von jeweils 2 µg/ml eingeteilt. Die Kulturüberstände wurden dazu entweder direkt (▨) oder nach Anreicherung der Globuline durch Fällung mit Ammoniumsulfat (□) auf die Säule aufgetragen und die MCA eluiert (Methoden 2.10.2).

Ein weiterer Grund könnte verringertes Zellwachstum und Stoffwechsel in grossvolumigen Massenkulturen (>500 ml) aufgrund einer Anhäufung von Abfallprodukten oder schlechterer Temperatur- oder pH-Regulation sein.

7. CHARAKTERISIERUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER GEGEN T M V

Zur Bestimmung der Eigenschaften wurden durch Fällung mit Ammoniumsulfat angereicherte und/oder durch Affinitäts-Chromatographie an Protein A - Sepharose gereinigte monoklonale Antikörper aus Hybridoma-Kulturüberständen verwendet.

7.1 Immunoglobulin-Klassen und -Subklassen

Die Immunoglobulin (Ig)-Klassen und -Subklassen der monoklonalen Antikörper wurden mit dem ELISA entsprechend Tab. 13 und Schema 7 (Methoden 2.7.2.4) bestimmt. Von 100 untersuchten Hybridoma-Klonen produzierten 98% IgG_{2a} und 2% IgM. Von den leichten Ig-Ketten enthielten 26% der MCA eine Mischung von κ und λ, während 73% ausschliesslich κ- und 1% λ-leichte Ketten enthielten. Wenn κ- und λ-leichte Ig-Ketten in einer Mischung vorlagen, war die Reaktivität ($Ext._{405nm}$) der κ-Ketten im ELISA immer mehr als doppelt so hoch wie die der λ-Ketten.

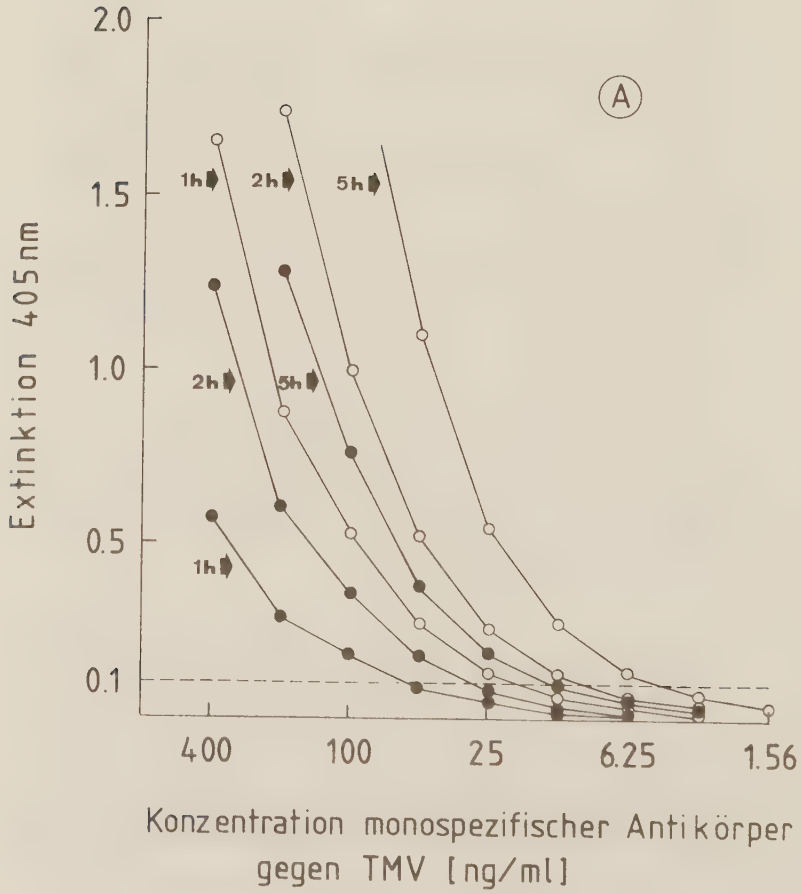
7.2 ELISA zur Bestimmung der Spezifität von MCA gegen TMV

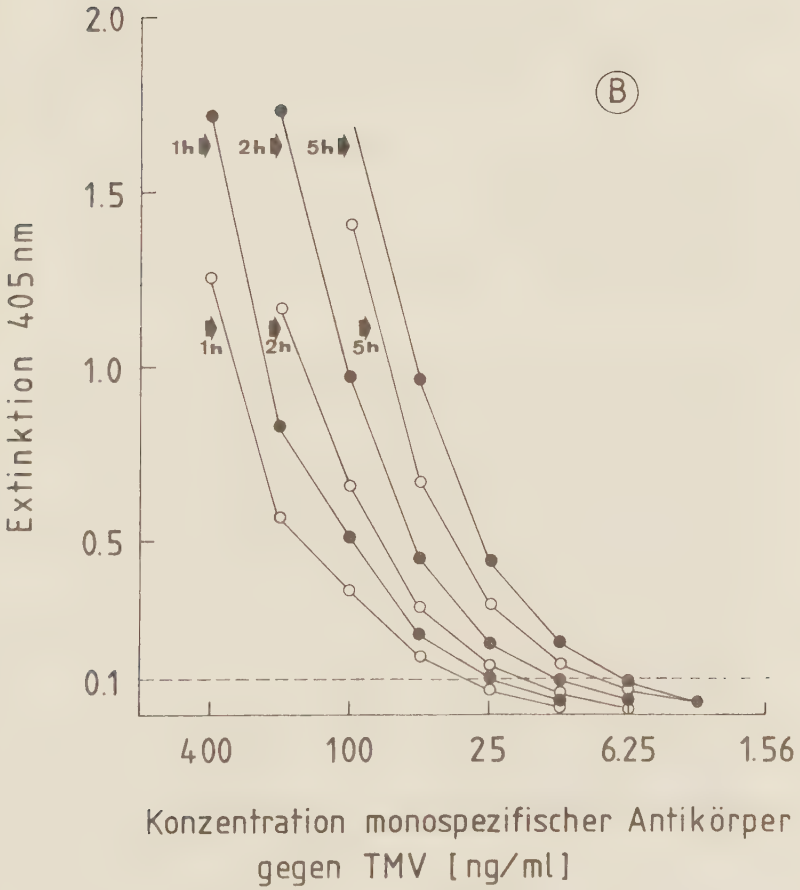
Zur Bestimmung der von Hybridomas sekretierten MCA-Mengen, sowie der Nachweisbarkeitsgrenze von Antikörpern im ELISA (Tab. 11) wurden, anhand einer Verdünnungsreihe polyklonaler, monospezifischer Ak gegen TMV und Beschichtung der Testplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen an TMV und TMVP, Eichkurven erstellt. Die $Ext._{405nm}$ wurde in Abhängigkeit von der Konzentration dieser monospezifischen Ak nach verschiedenen Inkubationszeiten aufgezeichnet (Abb. 15).

Entsprechend den beim jeweiligen Nachweis der angereicherten oder durch Affinitäts-Chromatographie gereinigten MCA verwendeten Testparametern, wurde die zutreffende Eichkurve ausgewählt und die der gemessenen Extinktion entsprechende Konzentration TMV-spezifischer Antikörper ermittelt. Die im ELISA gemessenen Extinktionswerte von 0.05 - 0.30 nach 5 h Substratinkubation (Tab. 28) entsprachen danach einer geschätzten Konzentration von 10-20 ng MCA/ml angereicherter Globuline (1 mg/ml).

Der anhand des Extinktionskoeffizienten berechnete Anteil monoklonaler Antikörper an den angereicherten Globulinen der Kulturüberstände beträgt 0.1-1% (Tab. 25). In 1 mg angereicherter Globuline sind demnach wirklich 1-10 µg MCA enthalten (vergl. Abb. 14). Damit war die anhand der Reaktivität im ELISA geschätzte MCA-Konzentration um den Faktor 100-1 000 zu niedrig. Anhand des Extinktionskoeffizienten für Antikörper berechnete Konzentrationen (Schreier *et al.*, 1980) von 100 µg gereinigter MCA/ml ergaben im ELISA (Tab. 11) bei den meisten MCA nach 5 h Substratinkubation Reaktivitäten von 0.1-0.3 $Ext._{405nm}$ (Tab. 30).

Abb. 15: Nachweis monospezifischer, polyklonaler Antikörper gegen TMV mit dem ELISA bei unterschiedlicher Beschichtung der Testplatten - II





Der ELISA wurde entsprechend Tab. 11 durchgeführt. Mikroelisa-Platten wurden beschichtet mit: TMV (A): 10 µg/ml (o-o); 1 µg/ml (●-●); TMV-Proteinmonomeren (B): 50 µg/ml (o-o); 10 µg/ml (●-●). Die monospezifischen Ak gegen TMV wurden in Probenpuffer in 2er-Schritten verdünnt. Die $Ext._{405nm}$ wurde nach 1, 2 und 5 h Substratinkubation gemessen. Jeder Wert stellt den Durchschnitt aus 12 Wiederholungen aus zwei getrennten Versuchsansätzen dar. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den gewählten Grenzwert für eine positive Reaktion zur Bestimmung der Nachweisbarkeitsgrenze der TMV-spezifischen Antikörper (Tab. 26).

Damit lagen die anhand der ELISA-Eichkurven geschätzten Konzentrationen (10-20 ng/ml) gegenüber den berechneten Konzentrationen der gereinigten MCA um einen Faktor von etwa 5 000-10 000 zu niedrig. Die gereinigten MCA der Hybridomalinie TMV-95 ergaben mit den gleichen ELISA-Parametern bei einer berechneten Konzentration von 100 µg/ml eine $Ext._{405nm}$ 13.5 (Tab. 30), was anhand der ELISA-Eichkurven (Abb. 15) eine um den Faktor 167 zu niedrig geschätzte Konzentration von nur 0.6 µg/ml ergab.

Diese grossen Unterschiede zwischen der aufgrund der Reaktivität der MCA im ELISA anhand von Eichkurven geschätzten und der anhand des Extinktionskoeffizienten nach Reinigung der MCA berechneten Konzentration erklären sich wahrscheinlich aus der unterschiedlichen Affinität der untersuchten monoklonalen wie polyklonalen Antikörper. Die heterogenen monospezifischen, polyklonalen Ak, mit denen die ELISA-Eichkurven erstellt wurden, sind eine Mischung von Ak verschiedener Affinität, von denen bevorzugt die Ak mit hoher Bindungsstärke nach den Waschvorgängen im ELISA gebunden bleiben, die mit geringer Affinität jedoch weggewaschen werden können (Lehtonen & Eerola, 1982).

Die Bindungsstärke der meisten gereinigten MCA war um den Faktor 10 000 und der MCA des Hybridoma-Klons TMV-95 um den Faktor 167 niedriger, als die der monospezifischen, polyklonalen Ak, so dass die Bindung im ELISA gering war. Diese Unterschiede ermöglichen einen Vergleich der relativen Affinität der MCA. So war die Affinität der MCA des Klons TMV-95 gegenüber TMV und TMVP und damit verknüpft die spezifische Aktivität (Tab. 30) 60x höher als bei den anderen in Tab. 30 aufgeführten MCA.

Je höher die Ak-Affinität, desto geringer sollte der Unterschied zwischen der berechneten und der anhand der Eichkurven mit den monospezifischen, polyklonalen Ak geschätzten Ak-Konzentration sein.

Die anhand der $Ext._{405nm}$ im ELISA (Tab. 9) geschätzten Konzentrationen von MCA in den Kulturüberständen lagen aufgrund dieser Erkenntnisse wahrscheinlich, ebenfalls in Abhängigkeit von der Antikörper-Affinität, wesentlich höher (vergl. Ergebnisse 5.1).

Die Nachweisbarkeitsgrenze der monospezifischen Antikörper gegen TMV im ELISA mit den Parametern zur Bestimmung der Spezifität monoklonaler Antikörper (Tab. 11) lag bei einem gewählten Grenzwert von 0.1 $Ext._{405nm}$ (Abb. 15) und einer Inkubationszeit von 5 h bei 37°C bei 6-25 ng Ak/ml (Tab. 26), d.h. bei 1.2-5 ng Ak in 200 µl, der Probengrösse, die regelmässig im ELISA eingesetzt wird.

Die geringsten Ak-Konzentrationen konnten durch Beschichten der Testplatten mit 10 µg TMV bzw. TMVP/ml nachgewiesen werden (Tab. 26, Abb. 15). Um die höchst mögliche Testempfindlichkeit zu erreichen, wurden diese Konzentrationen seither bei diesem Test verwendet.

Die Empfindlichkeit (Nachweisbarkeitsgrenze) der ELISA-Systeme zur Erfassung von MCA direkt in Kulturüberständen (3-25 ng Ak/ml; Tab. 18), sowie nach Anreicherung durch Fällung mit Ammoniumsulfat (6-25 ng/ml; Tab. 26) war nahezu gleich (1-10 x 10^{10} IgG-Moleküle/ml). Die Beschichtung der Testplatten mit 10 µg TMV bzw. TMVP/ml erbrachte in beiden Systemen die höchsten Extinktionswerte.

Tabelle 26: Nachweisbarkeitsgrenze von monospezifischen Antikörpern gegen TMV im ELISA[a)]

Virale Antigene[b)]	Konzentration beim Coating (µg/ml)	Nachweisbarkeitsgrenze (ng Ak/ml)		
		1 h[c)]	2 h[c)]	5 h[c)]
TMV	10	25	12	6
TMV	1	100	50	25
TMVP	50	50	25	12
TMVP	10	25	12	6

a) ELISA entsprechend Tab. 11; als Grenzwert für eine positive Reaktion wurde $Ext._{405nm}$ = 0.1 gewählt (Abb. 15)

b) TMV = TMV-Nukleokapsid; TMVP = TMV-Proteinmonomer

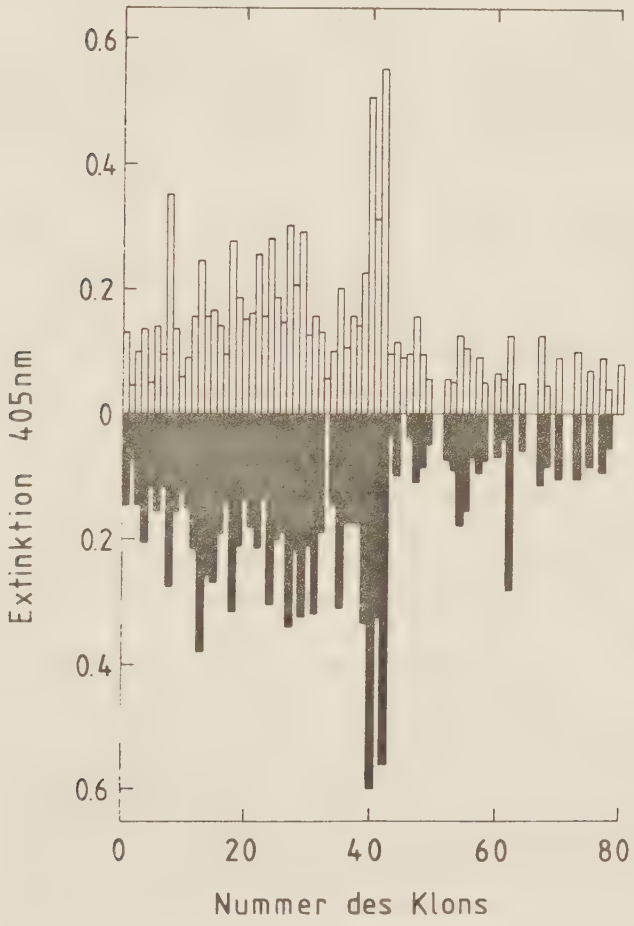
c) Inkubationszeiten des Substrats bei 37°C

7.3 Spezifität der monoklonalen Antikörper

Die Spezifität der monoklonalen Antikörper (MCA) wurde anhand ihrer Reaktivität mit verschiedenen viralen Antigenen im ELISA (Tab. 11) bestimmt.

Von den 68 in Abb. 16 dargestellten MCA-sekretierenden Hybridoma-Klonen reagierten 65 (95.6%) sowohl mit TMV als auch mit TMVP, also mit antigenen Determinanten (Epitopen), die sowohl im Nukleokapsid, als auch in den Proteinmonomeren von TMV *vulgare* zugänglich waren.

Abb. 16: Reaktivität monoklonaler Antikörper mit TMV und TMVP im ELISA



Die Reaktivität ($Ext._{405nm}$) monoklonaler Antikörper von 68 verschiedenen Hybridoma-Klonen mit dem Nukleokapsid (□) und den Proteinmonomeren (■) von TMV *vulgare* wurde mit dem ELISA entsprechend Tab. 11 nach 5 h Substratinkubation gemessen. Als Proben wurden angereicherte Globuline (1 mg/ml) der Hybridoma-Kulturüberstände verwendet, die etwa 1-10 µg MCA/ml enthalten (vergl. Tab. 25).

Ausschliesslich mit TMV reagierten 2 (2.9%) und ausschliesslich mit TMVP 1 (1.5%) der MCA. Diese MCA waren gegen Epitope gerichtet, die ausschliesslich im Nukleokapsid bzw. den Proteinmonomeren zugänglich oder vorhanden waren. Die Reaktivität der MCA, die gemeinsame Epitope im Nukleokapsid und den Proteinmonomeren von TMV *vulgare* erkennen, war bei 43.1% mit TMVP grösser, als mit TMV, bei 6.1% mit TMV grösser, als mit TMVP, sowie bei 50.8% mit TMV und TMVP gleich. Unterschiede der $Ext._{405nm} > 25\%$ wurden dabei als unterschiedliche Reaktivitäten gewertet. Die Reaktivität der einzelnen MCA nach 5 h Substratinkubation lag bei 0.05 - 0.60 $Ext._{405nm}$ (Abb. 16).

Die gegen TMV *vulgare* hergestellten MCA können auch antigene Determinanten des Nukleokapsids und/oder der Proteinmonomere anderer TMV-Stämme im ELISA erkennen (Tab. 27), d.h. die untersuchten Virusstämme verfügen über gemeinsame antigene Determinanten. Anhand der Reaktivität der MCA mit dem aufgrund der Aminosäuresequenz des Hüllproteins nah verwandten TMV-Stamm *dahlemense* (19% Aminosäureaustausche; Hollings & Huttinga, 1976) und dem weiter entfernt verwandten TMV-Stamm "Holmes' Ribgrass" (58% Aminosäureaustausche; Briand *et al.*, 1982) wurde das Auftreten von stammspezifischen und gruppenspezifischen Epitopen geprüft. Dabei wurden keine MCA festgestellt, die ausschliesslich mit einem TMV-Stamm reagierten, sondern bei allen MCA wurde eine gewisse serologische Kreuzreaktivität unterschiedlichen Ausmasses mit den untersuchten TMV-Stämmen festgestellt. Die MCA gegen TMV zeigten jedoch keinerlei Kreuzreaktivität mit Proteinen gesunder Tabakpflanzen und mit PLRV. Mit einer Ausnahme (MCA-130; vergl. Tab.27, 28) wurde auch keine Reaktivität der MCA mit ArMV festgestellt.

Tabelle 27: Bindung von monoklonalen Antikörpern an das Nukleokapsid und die Hüllprotein-Monomere von TMV-Stämmen im ELISA

Monoklonale Antikörper des Klons Nr.	Nukleokapsid und Hüllprotein-Monomeren der TMV-Stämme						
	TMV	TMV-*d*	TMV-HR	TMVP	TMVP-*d*	TMVP-HR	ArMV
5	=	+	+	+	-	o	o
11	=	=	+	+	=	=	o
14	=	=	-	+	-	-	o
22	=	-	-	-	-	-	o
23	=	+	-	-	+	-	o
28	=	o	-	=	o	-	o
38	=	-	-	=	-	-	o
39	o	o	+	+	+	o	o
41	=	o	=	=	o	o	o
47	=	=	=	=	-	-	o
77	=	=	=	=	=	-	o
80	=	+	o	o	+	o	o
92	=	=	+	=	=	+	o
95	=	=	=	=	=	=	o
117	=	+	=	=	+	+	o
124	=	=	=	=	=	+	o
130	=	=	=	=	=	=	-

ELISA entsprechend Tab. 11; TMV = TMV *vulgare*, TMVP = Hüllprotein-Monomere von TMV, TMV-Stämme = *dahlemense* (*d*) und Holmes'Ribgrass (HR).

=, gleiche Bindung, wie mit TMV *vulgare*; -, geringere Bindung, wie mit TMV *vulgare*; +, höhere Bindung, wie mit TMV *vulgare*; o, keinerlei Bindung.

Als Bindungsunterschied wurde eine Differenz der $Ext._{405nm} > 0.025$ (Fehlergrenze des Messgerätes Titertek Multiskan und gleichzeitig > 25% definiert.

Polyklonale Antikörper von mit TMV *vulgare* hyperimmunisierten Mäusen (Positivkontrolle) zeigten im ELISA keine Reaktivität mit Tabakproteinen, PLRV oder ArMV, reagierten aber mit dem Nukleokapsid, sowie den Proteinmonomeren aller 3 TMV-Stämme, wobei die $Ext._{405nm}$ mit TMV-*d* und TMV-HR grösser war, als mit TMV *vulgare*.

Die Differenzierung einer TMV *vulgare*-spezifischen antigenen Determinante war durch MCA-22 möglich. Gemeinsame antigene Determinanten von TMV und TMVP wurden durch MCA-28 und MCA-38 von den anderen TMV-Stämmen differenziert (Tab. 27). MCA-28 erkannte ein Epitop von TMV und TMVP, das beim HR-Stamm aufgrund der geringeren Reaktivität des MCA etwas verändert und beim Stamm *dahlemense* nicht zugänglich oder nicht vorhanden war.

TMV-*dahlemense* wurde von MCA-23 und MCA-80 differenziert. MCA-80 war gegen ein Epitop von TMV-*d* und TMVP-*d* gerichtet, das bei TMVP und dem HR-Stamm nicht vorhanden war.

Eine Differenzierung von TMVP-HR war durch MCA-124, des Nukleokapsids und der Proteinmonomeren des HR-Stammes mit MCA-92 möglich.

MCA-39 reagierte mit einem Epitop, das beim Nukleokapsid von TMV, TMV-*d*, sowie TMVP-HR fehlte, bei TMVP und TMVP-*d*, sowie TMV-HR jedoch zugänglich war. MCA-41 reagierte mit einem Epitop, das beim Stamm *dahlemense* und bei TMVP-HR nicht zugänglich war oder fehlte.

Gemeinsame antigene Determinanten des Nukleokapsids und der Proteinmonomere von TMV *vulgare*, *dahlemense*, und HR wurden von MCA-95 bzw. MCA-130 erkannt.

Die Reaktivität von MCA-130 mit ArMV war zwar gering (vergl. Tab. 28), wiederholte sich jedoch auch bei von diesem Klon abstammenden Zellinien und scheint auf eine geringe Kreuzreaktivität dieses MCA mit einer antigenen Determinante von ArMV hinzudeuten. Dies muss jedoch noch näher untersucht werden.

In Tab. 28 wird die Reaktivität einiger MCA mit dem Nukleokapsid und den Proteinmonomeren von TMV *vulgare*, *dahlemense* und Holmes'Ribgrass, sowie mit ArMV und PLRV im indirekten ELISA bei Verwendung von mit gereinigten viralen Antigenen beschichteten Testplatten (Tab. 11) gezeigt. Mit Antikörper-vorbeschichteten Testplatten (Tab. 12) war die $Ext._{405nm}$ nach der selben Inkubationszeit geringer.

Die Bindung eines MCA an verschiedene Virusstämme bedeutet, dass diese Stämme ein gemeinsames, sequentiell oder strukturell gleiches oder ähnliches Epitop besitzen, das von diesem MCA erkannt wird. Die in Tab. 28 angegebenen Extinktionswerte wurden zur Auffindung von kreuzreagierenden, gemeinsamen Epitopen (gemeinsamen Epitypen) der TMV-Stämme *vulgare*, *dahlemense* und Holmes'Ribgrass und ihrer Hüllproteine analysiert (Tab. 29). Dazu wurde der $\log_2$ des Quotienten aus der $Ext._{405nm}$ (ELISA) bei Bindung des MCA an das Nukleokapsid oder die Proteinmonomeren der heterologen Stämme und der $Ext._{405nm}$ bei Bindung an TMV *vulgare* berechnet und mit 100 multipliziert (Yewdell & Gerhard, 1981; Tab. 29). Geringere Reaktivitäten der MCA mit heterologen Virusstämmen oder ihren Proteinmonomeren resultierte in negativen Analysenwerten, wogegen höhere Reaktivitäten positive Werte zur Folge hatten.

Tabelle 28: Reaktivität von 8 monoklonalen anti-TMV Antikörpern mit dem Nukleokapsid und den Proteinmonomeren verschiedener TMV-Stämme und anderen Viren im ELISA

Monoklonale Antikörper des Klons Nr.	Antikörper-Reaktivität ($Ext._{405nm}$)[a] virale Antigene[b]							
	TMV	TMV-*d*	TMV-HR	TMVP	TMVP-*d*	TMVP-HR	ArMV	PLRV
47	0.069	0.056	0.056	0.051	0.033	0.017	0.000	0.000
109	0.076	0.082	0.068	0.063	0.061	0.096	0.000	0.000
117	0.232	0.270	0.210	0.252	0.284	0.306	0.000	0.000
118	0.127	0.151	0.120	0.143	0.137	0.169	0.000	0.000
119	0.084	0.092	0.086	0.095	0.109	0.114	0.000	0.000
123	0.116	0.119	0.108	0.121	0.123	0.152	0.000	0.000
124	0.173	0.182	0.151	0.171	0.162	0.221	0.000	0.000
130	0.050	0.072	0.056	0.064	0.057	0.069	0.017	0.000

a) ELISA entsprechend Tab. 11; $Ext._{405nm}$ nach 5 h Substratinkubation bei 37°C - $Ext._{405nm}$ mit den Proteinen von Tabakpflanzen; Probe:1 mg angereicherte Globuline von Hybridoma-Kulturüberständen/ml.

b) virale Antigene: Konz. vergl. Methoden 2.7.2.3; Abkürzungen: vergl. Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 29: Analyse kreuzreagierender Epitope von 3 TMV-Stämmen und ihren Hüllproteinen mit monoklonalen Antikörpern im ELISA

Monoklonale Antikörper des Klons Nr.	Reaktivität der monoklonalen Antikörper gegen virale Antigene						
	TMV	TMV-*d*	TMV-HR	TMVP	TMVP-*d*	TMVP-HR	ArMV
47	0.0	-30.1	-30.1	-43.6	-106.4	-202.1	-
109	0.0	+11.0	-16.0	-27.0	- 31.7	+ 33.7	-
117	0.0	+21.9	-14.4	+11.9	+ 29.2	+ 39.9	-
118	0.0	+25.0	- 8.2	+17.1	+ 10.9	+ 41.2	-
119	0.0	+13.1	+ 3.4	+17.8	+ 37.6	+ 44.1	-
123	0.0	+ 3.7	-10.3	+ 6.1	+ 8.5	+ 39.0	-
124	0.0	+ 7.3	-19.6	- 1.7	- 9.5	+ 35.3	-
130	0.0	+58.5	+16.3	+35.6	+ 18.9	+ 46.5	-155.6

Die Bindung der MCA an das Nukleokapsid und die Proteinmonomeren der TMV-Stämme *vulgare* (TMV), *dahlemense* (*d*) und Holmes'Ribgrass (HR) wurde mit dem ELISA (Tab. 11) bestimmt. Die Ergebnisse (Ext. $_{405nm}$ entsprechend Tab. 28) sind ausgedrückt als:

$$\log_2 \frac{\text{Bindung (Ext.405nm) an das heterologe Virus (Virusprotein)}}{\text{Bindung (Ext.405nm) an das homologe Virus}} \times 100$$

(vergl. Yewdell & Gerhard, 1981).

Ein Vergleich der Ergebnisse der Analysenwerte mit den Reaktivitäten der MCA mit den verschiedenen viralen Antigenen, relativ zur Reaktivität mit TMV, macht deutlich, dass die Aussagekraft entscheidend von der Höhe der $Ext._{405nm}$ im ELISA abhängt. Bei Annahme eines Grenzwertes von > 0.1 jedoch, bestätigen die Analysenergebnisse (Tab. 29) die in Tab. 27 dargestellten Reaktivitäten.

Bei einer Differenz der Analysenwerte (Tab. 29) von < +/- 100, d.h. Unterschieden in der $Ext._{405nm}$ im ELISA < 50%, wurde angenommen, dass es sich um eine gemeinsame antigene Determinante handelt. Dementsprechend wurde die von MCA-47 mit den Proteinmonomeren der TMV-Stämme *dahlemense* und Holmes'Ribgrass gemessene Extinktion nicht als Reaktivität gewertet, wobei die Aussagekraft aufgrund der geringen Gesamtreaktivität($Ext._{405nm}$ < 0.1) (Tab. 28) eingeschränkt war. Gleiches gilt für die von MCA-130 mit ArMV gemessene $Ext._{405nm}$. Die Analysenwerte der anderen in Tab. 29 dargestellten MCA wurden auf gemeinsame Epitope zurückgeführt. Die unterschiedliche Reaktivität mag verschiedene Gründe haben. Eine aufgrund der unterschiedlichen Aminosäuresequenz andere Ladungsverteilung der Hüllproteine, im Vergleich zum Typstamm, könnte zur bevorzugten Adsorption anderer Regionen an die Polystyrol-Oberfläche der Microelisa-Platten führen und damit die Zugänglichkeit zu einem Epitop verbessern oder verschlechtern.
Ebenso könnten sich die Epitope aufgrund von Sequenzunterschieden in wenigen Aminosäuren unterscheiden und aufgrund dessen einen MCA besser oder schlechter binden.

Um verschiedene MCA quantitativ miteinander vergleichen zu können, wurde die Stärke der Reaktivität eines MCA mit TMV bzw. TMVP im ELISA durch seine spezifische Aktivität ausgedrückt (Tab. 30). Die spezifische Aktivität eines MCA gibt die Zunahme der $Ext._{405nm}$ in einem definierten ELISA-System (Tab. 11) pro Zeiteinheit (h) bei einer Konzentration von 100 µg gereinigter MCA/Napf einer Microelisa-Platte an (Tab. 30).

Tabelle 30: Spezifische Aktivität monoklonaler Antikörper (MCA) mit TMV und TMVP im ELISA

MCA des Klons Nr.	Spezifische Aktivität (ELISA)[a]		
	TMV[b]	TMVP[b]	Differenz (%)
11	0.091	0.175	48.0
61	0.101	0.098	3.0
62	0.196	0.817	76.0
95	13.50	13.37[c]	1.0
135	0.102	0.117	12.8
136	0.089	0.099	10.1
137	0.313	0.230	26.5
138	0.220	0.150	31.8

a) Die spezifische Aktivität, d.h. die Zunahme der $Ext._{405nm}$ (ELISA) pro h und 100 µg affinitätschromatographisch gereinigter MCA ($Ext._{405nm}$/h/100 µg MCA) (Engvall & Perlmann, 1971) bei 37°C wurde im ELISA (Tab. 11) gemessen.

b) TMV = TMV-Nukleokapsid, TMVP = Proteinmonomeren des Stammes *vulgare*

c) vergl. Abb. 13

Die gereinigten MCA zeigten eine spezifische Aktivität mit TMV und TMVP zwischen 0.09 und 13.5. MCA-95 besass aufgrund seiner höheren Affinität für TMV und TMVP (vergl. 7.2) eine 16-148x höhere spezifische Aktivität, als die anderen in Tab. 30 dargestellten MCA. Die spezifische Aktivität der MCA mit TMV bzw. TMVP differierte bei den einzelnen Antikörpern um 1-76% (Tab. 30) und stimmte mit der als Histogram dargestellten Reaktivität der gefällten MCA (Abb. 16) überein.

Um bestimmen zu können, gegen welchen Bereich des Hüllproteins ein MCA gerichtet ist, wurde dessen Reaktivität mit isolierten nativen tryptischen oder chemisch synthetisierten Peptiden untersucht. Aus den tryptischen Peptiden von TMVP konnte bisher nur das N-terminale Peptid (Aminosäurereste 1-41) in ausreichender Menge gereinigt (vergl. Methoden 2.4.2.1) und seine serologische Aktivität mit polyklonalen Ak gegen TMV nachgewiesen werden. Das C-terminale Tetrapeptid von TMVP (Gly-Pro-Ala-Thr-OH) wurde chemisch synthetisiert und an Humanserumalbumin (HSA) bzw. Polylysin als polymere Träger gebunden. HSA mit 16 Peptidsubstituenten und Polylysin mit 68 Peptidsubstituenten reagierten im indirekten ELISA bis zu einer Nachweisbarkeitsgrenze von 1×10^{-9} g/ml vergleichbar mit polyklonalen Ak gegen TMV (vergl. Ergebnisse 3).

Anhand der Reaktivität verschiedener MCA mit diesen Peptiden im indirekten ELISA (Tab. 11) wurden 4 Hybridoma-Klone festgestellt, die MCA produzierten, die gegen das C-terminale Tetrapeptid von TMVP, oder ein Epitop, das dieses Peptid beinhaltet, gerichtet sind (Tab. 31).

Tabelle 31: Reaktivität monoklonaler Antikörper mit nativen und synthetisierten Peptiden von TMVP

Monoklonale Antikörper (MCA) des Klons Nr. [a]	virale Peptide		
	natives TP 1 [b]	C-terminales Tetrapeptid [c]	
		$HSA\text{-}STP_{16}$	$PL\text{-}STP_{68}$
44	negativ	0.025	0.227
62	negativ	negativ	0.965
11	negativ	negativ	>2.000
95	negativ	negativ	>2.000

Die Reaktivität der MCA (Ext.$_{405nm}$ nach 5 h Substratinkubation) wurde im indirekten ELISA entsprechend Tab. 11 bei Beschichtung der Platten mit 10 µg Peptid bzw. Konjugat/ml, bestimmt.

a) MCA-44 und 62: Angereicherte MCA (1 mg Globuline/ml) mit 1-10 µg MCA/ml; MCA-11 und 95: Gereinigte MCA (30 µg/ml)

b) natives tryptisches Peptid von TMVP (Aminosäurereste 1-41) (vergl. Ergebnisse 2.2)

c) synthetisiertes C-terminales Tetrapeptid H_2N-Gly-Pro-Ala-Thr-OH; Konjugate von Humanserumalbumin (HSA) mit 16 substituierten Peptidresten und Polylysin mit 68 Peptidsubstituenten.

Obwohl mit polyklonalen Ak gegen TMV die beiden verwendeten Peptidkonjugate im indirekten ELISA, unabhängig von der Art des Trägers, annähernd gleich reagierten (vergl. Tab. 18), war mit MCA die Reaktivität mit den beiden Konjugaten unterschiedlich. Bei Beschichtung der Testplatten mit 10 µg Konjugat/ml reagierten die MCA zwar mit dem Polylysin-Konjugat, jedoch nur schwach oder gar nicht mit den an HSA gebundenen Peptiden. Möglicherweise lagen die Ursachen dafür in einer unterschiedlichen strukturellen Anordnung der substituierten Peptide an den

Trägern, die sich bei Reaktion mit polyklonalen Ak in Konzentrationen von 1-10 µg/ml nicht bemerkbar machten, wohl aber bei höheren Konzentrationen gereinigter MCA (30-50 µg/ml) oder angereicherter MCA mit 99% nicht TMV-spezifischen Proteinen.

Die MCA der Hybridoma-Klone TMV-11, 44, 62 und 95 sind gegen eine antigene Determinante gerichtet, die am C-terminalen Ende der Polypeptidkette von TMVP lokalisiert ist und die Aminosäuresequenz Gly-Pro-Ala-Thr beinhaltet. Diese MCA reagierten alle mit dem Nukleokapsid und den Protein-Monomeren von TMV *vulgare* (Abb. 16, Tab. 30).

Weitere Untersuchungen des Klons TMV-95 zeigten, dass dessen MCA spezifisch die Infektiosität neutralisierten, d.h. nahezu vollständig die Infektiosität hemmten (Tab. 34). Die MCA der Klone TMV-11 und 62, die gegen den gleichen antigenen Bereich von TMVP gerichtet sind, führten zwar auch zu einer Hemmung, die jedoch 25-30% unter der Hemmung lag, die unspezifische Proteine (Negativkontrolle) verursachten (Tab. 33, 34).

Weitere Eigenschaften dieser beiden MCA waren eine um 48% bzw. 76% höhere Reaktivität mit TMVP als mit TMV (Tab. 30), sowie eine mehr als 16x geringere spezifische Aktivität als die MCA des Klons TMV-95.

7.4 Neutralisation der Infektiosität von TMV mit monoklonalen Antikörpern (MCA)

Zum Auffinden von antigenen Bereichen, die für die Infektiosität von TMV funktionell notwendig sind, wurde nach MCA gesucht, die durch Bindung an solche, an der Oberfläche der Virionen exponierte Epitope, zu einem Verlust an Infektiosität (Neutralisation) führten.

Bei Versuchen mit polyklonalen Antiseren trat neben der spezifischen Neutralisation der Virionen durch die Bindung von Antikörpern (95-99% Hemmung des Infektionserfolgs) auch eine nicht-spezifische Inaktivierung durch Proteine des Normalserums (24-70% Hemmung) auf (Anderer & Schlumberger, 1965, 1966; Anderer *et al.*, 1967).

Um spezifische Neutralisation und nicht-spezifische Inaktivierung quantitativ und reproduzierbar voneinander unterscheiden zu können, wurden statt Seren mit variierendem Proteingehalt und Zusammensetzung, die in Normalserum und Antiserum gegen TMV enthaltenen, gereinigten Antikörper (γ-Globulinfraktion) in definierten Konzentrationen als Kontrollen verwendet.

Zur Feststellung einer möglichen antiviralen Aktivität wurden angereicherte oder affinitätschromatographisch gereinigte MCA in definierten Konzentrationen mit TMV gemischt und die Infektiosität im Halbblatt-Biotest im Vergleich zur entsprechenden TMV-Konzentration ohne MCA anhand der Anzahl auftretender Lokalläsionen bestimmt (Methoden 2.11.4).

Um bei der Hemmung der Infektiosität quantitative Ergebnisse zu erhalten, sollten die Antikörper-Moleküle im Überschuss vorliegen (Anderer & Schlumberger, 1965). Zur Bestimmung des jeweiligen Überschusses an Ak-Molekülen gegenüber den TMV-Partikeln wurde die Anzahl von Molekülen der eingesetzten Virus- bzw. Ak-Menge anhand der Molekulargewichte (1 mol TMV = 4×10^7 g; 1 mol IgG = 1.5×10^5 g), sowie der Avogadro-Konstanten(6.023×10^{23} Moleküle/mol) berechnet (Tab. 32).

Tabelle 32: Verhältnis der Anzahl von Molekülen Antikörper zu Molekülen TMV bei der Neutralisation der Infektiosität

Monoklonale und polyklonale Antikörper		Antikörper-Moleküle : TMV-Moleküle [d] Tabak Mosaik Virus		
		1×10^{-7} g/ml 1.5×10^{3} Moleküle	1×10^{-6} g/ml 1.5×10^{10} Moleküle	1×10^{-5} g/ml 1.5×10^{11} Moleküle
angereicherte monoklonale Antikörper [a]	1×10^{-3} g Protein/ml			
	1×10^{-5} g MCA/ml			
	4×10^{13} Moleküle	2.67×10^{4}	2.67×10^{3}	2.67×10^{2}
	1×10^{-4} g Protein/ml			
	1×10^{-6} g MCA/ml			
	4×10^{12} Moleküle	2.67×10^{3}	2.67×10^{2}	2.67×10^{1}
gereinigte monoklonale Antikörper [b]	1×10^{-4} g MCA/ml			
	4×10^{14} Moleküle	2.67×10^{5}	2.67×10^{4}	2.67×10^{3}
	1×10^{-5} g MCA/ml			
	4×10^{13} Moleküle	2.67×10^{4}	2.67×10^{3}	2.67×10^{2}
polyklonale Antikörper aus Serum vom Kaninchen [c]	1×10^{-3} g Ak/ml			
	4×10^{15} Moleküle	2.67×10^{6}	2.67×10^{5}	2.67×10^{4}
	1×10^{-4} g Ak/ml			
	4×10^{14} Moleküle	2.67×10^{5}	2.67×10^{4}	2.67×10^{3}
	1×10^{-5} g Ak/ml			
	4×10^{13} Moleküle	2.67×10^{4}	2.67×10^{3}	2.67×10^{2}

a) Durch Präzipitation mit Ammoniumsulfat aus Hybridoma-Kulturüberständen angereicherte monoklonale Antikörper (MCA); der Anteil von MCA an den präzipitierten Globulinen beträgt etwa 1% (vergl. 6).

b) Durch Affinitäts-Chromatographie an Protein A -Sepharose gereinigte monoklonale Antikörper

c) gereinigte γ-Globulinfraktion aus Kaninchenserum (Ak)

d) Die der jeweiligen Konzentration an Antikörpern bzw. TMV entsprechende Menge von Molekülen wurde anhand der Molekulargewichte (IgG = 1.5×10^{5}; TMV = 4.0×10^{7}), sowie der Avogadro-Konstante (6.023×10^{23}) errechnet.

Die antigene Valenz von TMV bei der Bindung mit polyklonalen IgG im Überschuss (univalente Bindung) beträgt nach van Regenmortel & Hardie (1976) 780. Ein TMV-Partikel besitzt demnach 780 zugängliche Bindungsstellen für Antikörper. Wenn man für die Bindung von MCA an TMV eine Valenz der gleichen Grössenordnung annimmt, müssen bei einem Ak-Überschuss etwa 10^3 Ak-Moleküle mehr als TMV-Partikeln vorhanden sein.

Da nicht bei allen Kombinationen von TMV und Ak ein Überschuss an Ak-Molekülen gegeben war (Tab. 32), musste bei der Interpretation der Ergebnisse der Biotests das jeweilige Verhältnis Ak:TMV beachtet werden.

Zum Auffinden von neutralisierenden MCA wurden zunächst durch Fällung mit Ammoniumsulfat aus Hybridoma-Kulturüberständen angereicherte Globuline verwendet (Tab. 33), die etwa 1% MCA enthalten (Tab. 25), also zu 99% aus nicht TMV-spezifischen Globulinen bestanden.

Die angereicherten MCA führten bei einer Konzentration von 1×10^{-3} g Globulinen/ml (1×10^{-5} g MCA/ml) mit 1×10^{-6} und 1×10^{-7} g TMV/ml zu einer Hemmung der Infektiosität von 93-99%. Die nicht-spezifische Inaktivierung durch die Ak aus Normalserum war jedoch nur unwesentlich (0.8-6.5%) niedriger als die durch Ak aus Antiserum gegen TMV verursachte Hemmung der Infektiosität. Die nicht-spezifische Hemmung der Infektiosität tritt bei höheren Proteinkonzentrationen auf als der spezifische Neutralisationseffekt (van Regenmortel, 1982). Bei einer Proteinkonzentration von 1×10^{-3} g/ml, wovon sowohl bei den angereicherten MCA als auch bei den Ak aus Antiserum gegen TMV nur ein Teil TMV-spezifische Ak sind, wurde die spezifische Neutralisation somit durch die nicht-spezifische Inaktivierung überdeckt.

Tabelle 33: Neutralisation der Infektiosität von TMV *vulgare* mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern - I

Antikörper-probe [a]	Proteinkonzentration (g/ml)	Hemmung der Infektiosität (%) [b] TMV-Konzentration (g/ml)		
		1×10^{-7}	1×10^{-6}	1×10^{-5}
MCA-8	1×10^{-3}	-	93.4	96.0
MCA-27	1×10^{-3}	-	96.0	94.9
MCA-42	1×10^{-3}	-	95.3	96.6
MCA-92	1×10^{-3}	-	97.8	91.9
MCA-92	1×10^{-3}	98.7	96.6	93.3
MCA-95	1×10^{-3}	99.3	99.0	95.4
MCA-95	1×10^{-3}	-	97.6	95.3
MCA-95	1×10^{-3}	99.3	98.4	96.5
Ak aus NS	1×10^{-3}	97.8	92.8	62.2
Ak gegen TMV	1×10^{-3}	98.6	99.3	98.5
Ak gegen TMV	1×10^{-3}	-	95.5	94.7
MCA-8	1×10^{-4}	32.6	76.5	55.1
MCA-11	1×10^{-4}	12.7	24.0	14.8
MCA-18	1×10^{-4}	58.1	65.6	38.2
MCA-22	1×10^{-4}	57.3	53.2	32.0
MCA-24	1×10^{-4}	53.4	31.9	59.5
MCA-27	1×10^{-4}	66.5	75.8	37.3
MCA-40	1×10^{-4}	60.0	69.4	48.4
Ak aus NS	1×10^{-4}	44.2	69.7	48.2
Ak gegen PVX	1×10^{-4}	39.9	72.6	45.8
Ak gegen TMV	1×10^{-4}	88.9	93.0	80.2

a) MCA = durch Fällung aus Hybridoma-Kulturüberständen mit Ammoniumsulfat angereicherte monoklonale Antikörper
Ak = gereinigte γ-Globulinfraktion aus Kaninchenserum
NS = Normalserum, d.h. Serum aus nicht immunisierten Tieren
TMV = Tabak Mosaik Virus; PVX = Potato Virus X

b) $\text{Hemmung der Infektiosität (\% des Standards)} = 100 - \left(\frac{\text{Läs./Hb \{TMV+Ak\}}}{\text{Läs./Hb \{TMV\}}} \times 100\right)$;
vergl. Methoden 2.11.4

Bei 1 x 10^{-5} g TMV/ml betrug der Unterschied zwischen der Hemmung durch Ak aus Normalserum (62.2%) sowie der Hemmung durch Ak gegen TMV (94.7-98.5%) 32.5-36.3%. Die MCA hemmten bei dieser TMV-Konzentration 91.9-96.6% der Infektiosität. Da die MCA-Moleküle jedoch bei dieser Verdünnung nicht im Oberschuss vorlagen (Tab. 32), war die Interpretation erschwert.

Die MCA der Klone TMV-92 und 95 zeigten, aufgrund des internen Standards beim Halbblatt-Biotest, auch bei verschiedenen Testansätzen eine gute Reproduzierbarkeit (Tab. 33) mit Schwankungen in der Hemmung von maximal 1.5%.

Bei einer geringeren Proteinkonzentration von 1 x 10^{-4} g/ml war die Hemmung von TMV durch Ak von Normalserum oder Antiserum gegen Kartoffelvirus X bei TMV-Konzentrationen von 10^{-7} - 10^{-5} g/ml deutlich (20-50%) niedriger als die Hemmung durch Ak gegen TMV (Tab. 33). Jedoch nur mit 1 x 10^{-7} g TMV/ml war ein Oberschuss der MCA gegeben (Tab. 32); die Zahl der Läsionen/Halbblatt des Standards (Virus ohne Ak) aber, in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Testpflanzen, betrug nur 10-60, so dass die Genauigkeit der Aussage über das Ausmass der Hemmung teilweise eingeschränkt war. Für genaue Aussagen sind 50-100 Läsionen/Halbblatt erforderlich. Aufgrund der geringen Zahl von TMV-Partikeln war die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens mit TMV-spezifischen Ak verringert, so dass vermutlich viele Partikeln der Neutralisation entkamen und daher niedrige Hemmwerte erhalten wurden. Mit zunehmender TMV-Konzentration (1 x 10^{-6} g/ml) trat die spezifische Neutralisation verstärkt zutage, als gegenläufiger Effekt waren aber die MCA nicht mehr im Oberschuss vertreten (Tab. 32).

Bei 1 x 10^{-5} g TMV/ml betrug das Verhältnis Ak:TMV sogar nur noch 10:1 Moleküle, was zu einem Absinken der Hemmung der Infektiosität von TMV führte, da aufgrund der geringen Ak-Zahl sicherlich viele Virionen der Neutralisation entgingen (Tab. 33, Abb. 17). Mit Ausnahme von MCA-24 stieg die Hemmung der Infektiosität bei 1 x 10^{-6} g TMV/ml an, fiel dann aber bei 1 x 10^{-5} g TMV/ml wieder ab (Abb. 17).

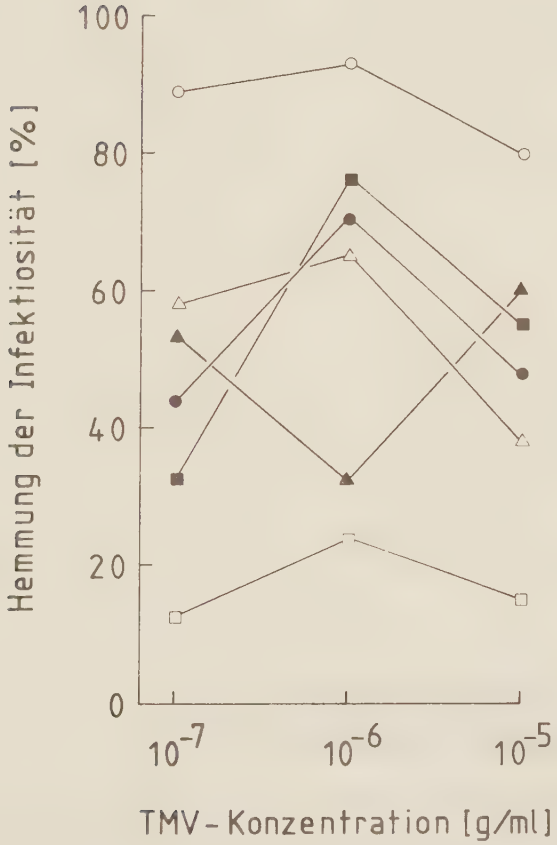
Es liess sich eindeutig feststellen, dass die MCA des Klons TMV-11 die Infektiosität von TMV nicht neutralisierten, sondern eher förderten, da der Prozentsatz der Hemmung um mehr als 30% unterhalb demjenigen der anderen MCA und der Ak aus Normalserum (Negativkontrolle) lag.

Um die Hemmung von TMV durch nicht TMV-spezifische Proteine (99%) der angereicherten MCA zu eliminieren, wurden bei weiteren Versuchen affinitäts-chromatographisch gereinigte MCA (1 x 10^{-4}, 1 x 10^{-5} g/ml) verwendet (Tab. 34). Als Positivkontrolle wurden dementsprechend monospezifische, polyklonale Ak gegen TMV benutzt.

Es konnte gezeigt werden, dass die MCA des Klons TMV-95 die Infektiosität von TMV *vulgare* spezifisch neutralisieren, d.h. gegen eine antigene Determinante gerichtet sind, deren Blockierung zu einem Verlust der Infektiosität der Virionen führte.

Die MCA der Klone TMV-62 und TMV-92 zeigten, im Vergleich mit TMV-95, sowie der Negativkontrolle, keine neutralisierenden Eigenschaften. Die MCA von TMV-62 übten sogar, wie TMV-11, einen die Infektiosität fördernden Effekt aus, da der Prozentsatz der Hemmung durch diese MCA um 25% unter derjenigen, der Ak des Normalserums lag.

Abb. 17: Neutralisation der Infektiosität von TMV mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern in Abhängigkeit von der TMV-Konzentration



Die Neutralisation der Infektiosität von TMV *vulgare* wurde im Biotest (Methoden 2.11.4) mit Antikörpern konstanter Konzentration ($1x10^{-4}$ g/ml) bestimmt:

(o - o) Ak gegen TMV (polyklonal)
(● - ●) Ak aus Normalserum
(■ - ■) MCA-8
(□ - □) MCA-11
(△ - △) MCA-18
(▲ - ▲) MCA-24

Tabelle 34: Neutralisation der Infektiosität von TMV *vulgare* mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern - II

Antikörper-probe [a]	Proteinkonzentration (g/ml)	Hemmung der Infektiosität (%) [b] TMV-Konzentration (g/ml)	
		1×10^{-6}	1×10^{-5}
MCA-62	1×10^{-4}	43.9	-
MCA-92	1×10^{-4}	66.2	53.1
MCA-95	1×10^{-4}	93.6	75.6
Ak aus NS	1×10^{-4}	69.5	31.0
mAk gegen TMV	1×10^{-4}	93.1	81.0
MCA-92	1×10^{-5}	60.0	37.5
MCA-95	1×10^{-5}	82.5	32.6
Ak aus NS	1×10^{-5}	58.9	41.5
mAk gegen TMV	1×10^{-5}	82.2	55.8

a) MCA = durch Affinitäts-Chromatographie an Protein A - Sepharose gereinigte monoklonale Antikörper

Ak = gereinigte γ-Globulinfraktion aus Kaninchenserum

mAk = monospezifische Antikörper aus Kaninchenserum

NS = Normalserum, d.h. Serum aus nicht immunisierten Kaninchen

TMV = Tabak Mosaik Virus

b) Hemmung der Infektiosität = $100 - \left(\frac{\text{Läs./Hb \{TMV+Ak\}}}{\text{Läs./Hb \{TMV\}}} \times 100\right)$; (% des Standards)

vergl. Methoden 2.11.4

Ein optimales Testsystem zur Auffindung neutralisierender MCA war bei Kombination von 1 x 10^{-5} - 1 x 10^{-6} g TMV/ml und 1 x 10^{-4} g gereinigter MCA/ml, die damit in einem Oberschuss von 10^{3}-10^{4} Molekülen vorhanden waren, gegeben. Dabei betrug der Unterschied der nicht-spezifischen Inaktivierung durch Ak aus Normalserum und der spezifischen Neutralisation durch monospezifische, polyklonale Antikörper gegen TMV 23-50%. Die spezifische Neutralisation von TMV durch monospezifische Ak und MCA des Klons TMV-95 war gleich gross, wobei immer eine Rest-Infektiosität, z.B. aufgrund von aggregierten, und damit teilweise nicht zugänglichen Virionen, verblieb (vergl.: van Regenmortel, 1982).

Bei Verringerung der MCA-Konzentration auf 1 x 10^{-5} g/ml wurden mit 1 x 10^{-6} g TMV/ml (Ak:TMV = 10^{3} Moleküle) noch gut differenzierbare Ergebnisse erzielt, die Hemmung der Infektiosität war jedoch vermindert. Mit 1 x 10^{-5}g TMV/ml waren die Ak dagegen nicht mehr im Oberschuss, die Hemmung der Infektiosität sank unter 40% und der Unterschied zwischen spezifischer und nichtspezifischer Hemmung durch die polyklonalen Antikörper betrug nur noch 14%.

7.5 Charakterisierung einer antigenen Determinante anhand der Reaktivität monoklonaler Antikörper

Durch die Bestimmung der Reaktivität der monoklonalen Antikörper (MCA) des Hybridoma-Klons TMV-95 (Tab. 35) war es möglich, eine antigene Determinante (Epitop) anhand ihrer Lage im Protein, Aminosäuresequenz, Funktion und Verbreitung bei mehreren verwandten Virusstämmen zu charakterisieren.

Tabelle 35: Reaktivität der monoklonalen Antikörper des Hybridoma-Klons TMV-95

Ig-Klasse[a]	spezifische[b] Aktivität		Reaktivität mit heterologen[c] Virusstämmen und ihren Proteinmonomeren				Aminosäuresequenz[d] des Hüllproteins von TMV *vulgare*	Neutralisation[e] der Infektiosität von TMV
	TMV	TMVP	TMV-*d*	TMV-HR	TMVP-*d*	TMVP-HR		
IgG_{2a}, κ	13.5	13.37	+	+	+	+	Gly-Pro-Ala-Thr-OH (C-terminales Peptid)	+

a) vergl. 7.1; b) Tab. 30; c) Tab. 27; d) Tab. 31; e) Tab. 34

Die MCA des Klons TMV-95 sind gegen ein im C-terminalen Bereich der Polypeptidkette von TMVP gelegenes Epitop gerichtet, das 1) die Aminosäuresequenz Gly-Pro-Ala-Thr (Reste 155-158) beinhaltet, 2) an der Oberfläche des Nukleokapsids und der Proteinmonomeren exponiert ist, 3) bei den Stämmen *dahlemense* und Holmes' Ribgrass ebenfalls nachweisbar ist (gemeinsamer Epityp), und 4) eine Funktion beim Infektionsvorgang hat.

Aufgrund der Reaktivität dieser MCA, sowohl mit TMV als auch mit TMVP, konnte geschlossen werden, dass die MCA gegen ein Epitop des TMV Typstammes (*vulgare*) gerichtet sind, das sowohl im Nukleokapsid als auch in den Monomeren des Hüllproteins exponiert ist, somit an der Oberfläche von TMV und TMVP lokalisiert sein muss, also möglicherweise im C- oder N-terminalen Bereich des TMVP liegt. Die MCA hatten eine im Vergleich mit anderen gereinigten MCA hohe spezifische Aktivität und damit auch hohe Affinität für dieses Epitop (vergl. 7.2). Da die MCA eine gleich starke Reaktivität mit dem Nukleokapsid und den Proteinmonomeren der TMV-Stämme *dahlemense* und Holmes' Ribgrass im ELISA zeigten, wurde auf eine gemeinsame, bei allen diesen Stämmen vorkommende antigene Determinante (gemeinsamer Epityp) geschlossen. Anhand der Reaktivität der MCA mit dem synthetisierten C-terminalen Tetrapeptid H_2N-Gly-Pro-Ala-Thr-OH des TMV Typstammes und keiner Reaktivität mit dem N-terminalen tryptischen Peptid konnte direkt die Lage im C-terminalen Bereich von TMVP und ein wichtiger Bestandteil der Aminosäuresequenz des Epitops entdeckt werden. Da die MCA TMV *vulgare* spezifisch neutralisierten, die Blockierung dieses Epitops also zum Verlust der Infektiosität führte, konnte dem Epitop eine Funktion beim Infektionsvorgang zugeordnet werden.

8. CHARAKTERISIERUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER GEGEN A r M V UND P L R V

Zur Bestimmung der Eigenschaften der monoklonalen Antikörper (MCA), die von Hybridomas produziert wurden, die durch Fusion von Milzzellen aus mit ArMV (ATCC-Stamm)-hyperimmunisierten Mäusen mit Myelomzellen hergestellt wurden, wurden MCA verwendet, die zuvor durch Fällung mit Ammoniumsulfat aus Hybridoma-Kulturüberständen angereichert wurden (vergl. Ergebnisse 6).

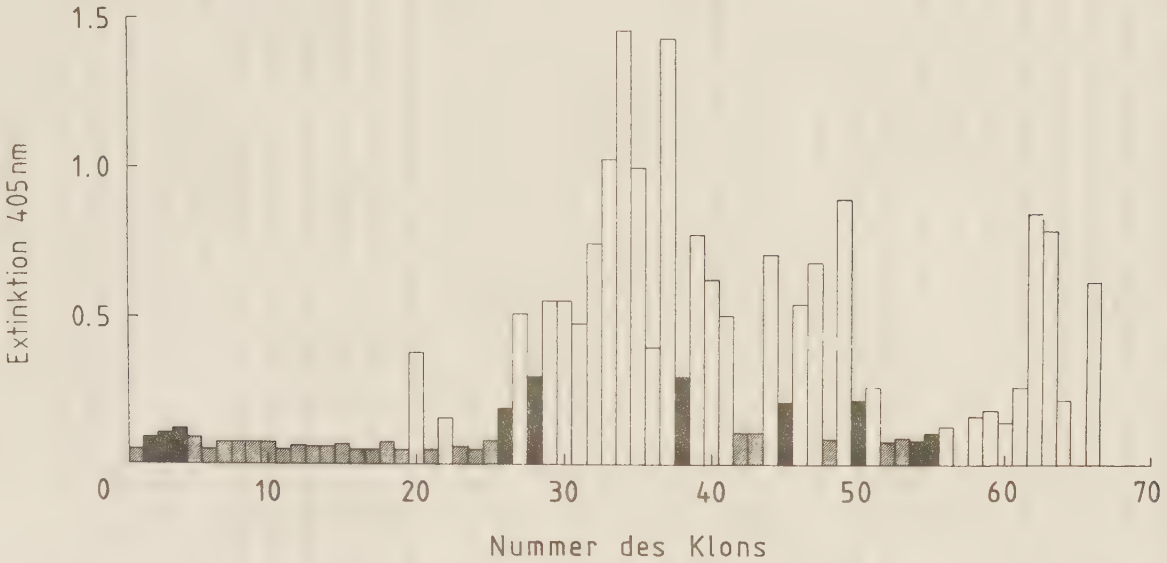
8.1 Immunoglobulin-Klassen und Subklassen

Die Immunoglobulin-Klassen und -Subklassen der MCA wurden mit dem ELISA entsprechend Tab. 13, Schema 7 bestimmt. Von den 62 isolierten ArMV-Ak-sekretierenden Hybridoma-Klonen (vergl. 5.2) produzierten 29 (46.8%) IgG_1, 23 (37.1%) IgA und 10 (16.1%) IgM (Abb. 18). Ausschliesslich κ-leichte Ketten wurden bei 5 (8.1%), eine Mischung von κ- und λ-Ketten bei 57 (91.9%) der monoklonalen Antikörper nachgewiesen, wobei die Reaktivität ($Ext._{405nm}$) der κ-Ketten immer mehr als doppelt so hoch wie die der λ-Ketten war (vergl. 7.1).

8.2 Spezifität der monoklonalen Antikörper (MCA)

Zum Screening von ArMV-Ak-sekretierenden Hybridomas mit dem ELISA wurden gereinigte Virionen des auch zur Immunisierung von Mäusen verwendeten ArMV-Stammes AB10 der American Type Culture Collection (ArMV-ATCC) benutzt.

Abb. 18: Immunoglobulin-Klassen monoklonaler Antikörper und Reaktivität mit ArMV im ELISA



Die Immunoglobulin-Klassen und Subklassen IgA (▨), IgM (■) und IgG_1 (□) der monoklonalen Antikörper von 62 Hybridoma-Klonen (die Klone 1 und 19, sowie 8 und 52 sind identisch) wurden mit dem ELISA entsprechend Tab. 13 bestimmt. Die Reaktivität ($Ext._{405nm}$) der MCA mit dem Stamm AB10 (ATCC) von Arabis Mosaik Virus wurde mit dem ELISA entsprechend Tab. 12 (Schema 6,B) nach 5 h Substratinkubation gemessen. Als Proben wurden angereicherte Globuline der Hybridoma-Kulturüberstände, 1:5 mit Probenpuffer verdünnt, verwendet.

Die MCA der isolierten Hybridoma-Klone reagierten im indirekten ELISA (Tab. 12) unterschiedlich stark mit den gereinigten Virionen dieses ArMV-Stammes (Abb. 18), vermutlich aufgrund unterschiedlicher Affinitäten und/oder Epitop-Spezifitäten der MCA. Beim Vergleich der Reaktivität der MCA mit ihrer Immunoglobulinklasse konnte eine Korrelation festgestellt werden. So betrug nach 5 h Substratinkubation die $Ext._{405nm}$ der MCA der IgA-Klasse 0.05-0.1, der MCA der IgM-Klasse 0.1-0.3, sowie der MCA der IgG_1 -Subklasse 0.15-1.45 (Abb. 18). Die 29 MCA der IgG_1-Subklasse (vergl. 7.1) wurden, da sie die stärkste Reaktivität mit ArMV aufwiesen, zunächst anhand ihrer Spezifität charakterisiert. Die Charakterisierung der anderen gegen ArMV gerichteten MCA bleibt späteren Untersuchungen vorbehalten.

Polyklonales Antiserum von mit ArMV-ATCC-hyperimmunisierten STU-Mäusen reagierte auch mit dem schweizer PLRV-Isolat (PLRV-CH). Um diese unerwartete Reaktivität weiter zu untersuchen und zu prüfen, ob Antiserum aus mit PLRV hyperimmunisierten Mäusen auch Kreuzreaktivität mit ArMV-ATCC zeigte, wurde die Reaktivität beider Antiseren mit verschiedenen ArMV-Stämmen, Isolaten von PLRV des Kartoffelzentrums in Lima, sowie TMV und TMVP untersucht. Dazu wurde das gleiche ELISA-Verfahren wie für die Bestimmung der Spezifität der MCA (Tab. 12) verwendet. Sowohl durch Immunisierung mit PLRV als auch durch Immunisierung mit ArMV erhaltene Antiseren reagierten mit allen PLRV-Isolaten und den ArMV-Stämmen ATCC, S und E, sowie gering mit TMV und TMVP. Antiserum gegen ArMV reagierte, im Gegensatz zu Antiserum gegen PLRV, jedoch nicht mit ArMV-ivy und Protein von ArMV-ATCC.

Da Experimente mit Antiseren und Virusisolaten von ArMV und PLRV aus anderen Quellen diese Ergebnisse bestätigten, (Tab. 36), konnten Verunreinigungen der selbst hergestellten Antiseren oder gereinigten Viren als Grund für die Kreuzreaktivität ausgeschlossen werden. ArMV und PLRV müssen daher über gemeinsame antigene Determinanten verfügen.

Tabelle 36: Reaktivität polyklonaler Antiseren von mit ArMV-bzw. PLRV-hyperimmunisierten Tieren

Antiserum gegen	produziert in	Herkunft	Reaktivität mit Viren	
			ArMV	PLRV
ArMV	Mäusen	selbst	+	+
ArMV	Kaninchen	ATCC	+	+
PLRV	Mäusen	selbst	+	+
PLRV	Kaninchen	Inotech	+	+
PLRV	Kaninchen	P.Gugerli	(+)	+

Die Reaktivität der Antiseren wurde im ELISA entsprechend Tab. 6 und 7 durchgeführt und die $Ext._{405nm}$ nach 1-2 h Substratinkubation gemessen. Zum Beschichten der Testplatten wurden gereinigtes ArMV (5 µg/ml) bzw. PLRV (1 µg/ml) verwendet, die EMA→Maus- bzw. Kaninchen-Antikörper wurden 1:500 und die Antiseren, sowie als Kontrolle Normalseren, 1:1 000 - 1:2 000 verdünnt.

Aufgrund der mit den polyklonalen Antiseren entdeckten Kreuzreaktivität von ArMV und PLRV wurde, um festzustellen, ob auch MCA mit Spezifität für ArMV und/oder PLRV erhalten wurden, die Reaktivität der MCA nicht nur mit verschiedenen ArMV-Stämmen, sondern auch mit weltweiten Isolaten von PLRV, sowie TMV und TMVP im ELISA (Tab. 12) untersucht. Als Negativkontrollen wurden bei Verwendung gereinigter Viren Probenpuffer, bei Virus-infiziertem Pflanzensaft die entsprechenden Säfte gesunder Pflanzen (*P. floridana*, Gurken, Petunien) verwendet. Die durch gesunden Pflanzensaft in diesem ELISA-System auftretenden unspezifischen Reaktionen wurden bei der Auswertung von der $Ext._{405nm}$ der MCA mit Virus-infiziertem Pflanzensaft abgezogen. Die unspezifische Reaktion gesunder Pflanzensäfte unterschied sich in Abhängigkeit von der Stärke der Reaktivität der jeweiligen MCA.

Von den 29 IgG_1-sekretierenden Hybridoma-Klonen reagierten 14 mit allen untersuchten ArMV-Stämmen, d.h. sie sind gegen gemeinsame, gruppenspezifische Epitope der Stämme gerichtet. Zwischen den ArMV-Stämmen diskriminieren konnten dagegen 15 MCA, da sie gegen Epitope gerichtet waren, die 2-3 Stämmen gemeinsam waren, bei anderen Stämmen aber fehlten oder nicht zugänglich waren. Eine Auswahl von MCA unterschiedlicher Spezifität und Reaktivität ist in Tab. 37 dargestellt. Quantitative Vergleiche der Reaktivität eines MCA mit verschiedenen Virusstämmen oder -isolaten ist nicht möglich, da der Virusgehalt der infizierten Pflanzensäfte nicht bekannt und möglicherweise unterschiedlich war. Dagegen ist ein Vergleich der Reaktivität verschiedener MCA mit einem Virusstamm möglich.

Tabelle 37: Reaktivität von 8 monoklonalen anti-ArMV-Antikörpern mit verschiedenen Virusstämmen und Viren im ELISA

Antigen	Reaktivität der MCA (Ext.$_{405nm}$)							
	MCA-20	MCA-35	MCA-44	MCA-46	MCA-47	MCA-61	MCA-62	MCA-64
ArMV-Protein	0.369	0.388	0.328	negativ	0.184	0.237	1.717	0.298
ArMV-ATCC	0.187	0.257	0.038	0.145	0.219	0.162	1.110	0.184
ArMV-ATCC*	-	0.511	0.834	0.839	0.948	0.443	0.565	0.076
ArMV-S*	0.866	0.137	negativ	0.370	0.138	0.084	0.058	negativ
ArMV-ivy*	0.153	0.252	0.241	0.315	negativ	0.204	0.380	0.070
ArMV-E*	0.806	0.104	negativ	negativ	negativ	negativ	0.353	0.060
PLRV-CH*	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
PLRV-710*	0.702	1.036	0.690	0.464	0.598	0.326	0.064	negativ
PLRV-712*	1.116	1.468	1,140	0.756	1.036	0.484	0.164	0.072
PLRV-713*	1.414	1.860	1.588	0.978	1.388	0.786	0.342	0.140
PLRV-714*	1.086	1.496	1.246	0.716	1.074	0.524	0.210	0.056
PLRV-716*	0.886	1.314	1.070	0.608	0.806	0.436	0.132	0.074
PLRV-720*	1.784	>2.000	>2.000	1.436	>2.000	1.084	0.486	0.214
PLRV-723*	0.880	1.218	1.164	0.712	1.094	0.532	0.204	0.054
TMV	0.189	0.137	0.155	0.129	0.174	0.135	1.388	0.284
TMV-Protein	0.599	0.486	0.624	0.374	0.628	0.312	1.973	0.526

Die Reaktivität der monoklonalen Antikörper (MCA) wurde im ELISA entsprechend Tab. 12 bestimmt und die Ext.$_{405nm}$ nach 1 h Substratinkubation gemessen. Als Proben wurden angereicherte Globuline (1 mg/ml) aus Hybridoma-Kulturüberständen verwendet.
Charakterisierung der viralen Antigene: Material 1.1; * = Virus in 1:10 mit Probenpuffer verdünntem, infiziertem Pflanzensaft

1. Reaktivität der MCA mit den ArMV-Stämmen ATCC, S, E und ivy, sowie dem Hüllprotein von ArMV-ATCC

Alle MCA reagierten mit ArMV-ATCC (Tab. 37; vergl. Abb. 18). Die $Ext._{405nm}$ der MCA-20, 35, 44, 46, 47 und 61 war dabei mit Virus-infiziertem Petuniensaft mehr als 2x stärker als mit den gereinigten Virionen. Dagegen reagierten MCA-62 und 64 mit ArMV-ATCC-infiziertem Petuniensaft 2 x geringer als mit gereinigten Virionen dieses ArMV-Stammes. Möglicherweise sind diese MCA gegen Epitope gerichtet, die nach der Reinigung der Viren besser zugänglich waren.

MCA-46 ist gegen ein Epitop gerichtet, das nur beim Nukleokapsid vorzukommen scheint. Die anderen MCA sind gegen Epitope gerichtet, die sowohl bei ArMV als auch bei ArMVP exponiert sind. Die meist erhöhte Reaktivität der MCA mit ArMVP beruht möglicherweise auf der höheren Konzentration des Hüllproteins von ArMV (10 µg/ml) als des gereinigten Nukleokapsids desselben Stammes (5 µg/ml) im ELISA (vergl. Tab. 12).

Die untersuchten ArMV-Stämme sind serologisch miteinander verwandt. Mit Hilfe der MCA konnten gruppenspezifische, d.h. allen Stämmen gemeinsame Epitope gefunden werden (MCA-20, 35, 62). Gemeinsame Epitope von 2-3 Stämmen, die bei den anderen Stämmen nicht vorhanden waren, konnten mit anderen MCA unterschieden werden. So wurden gemeinsame Epitope der Stämme ATCC + ivy (MCA-44), ATCC + S (MCA-47), ATCC + ivy + E (MCA-64), sowie ATCC + S + ivy (MCA-61,46) aufgefunden, wobei das von MCA-46 erkannte Epitop im isolierten Protein von ArMV-ATCC nicht zugänglich war.

Auf das Vorhandensein getrennter Epitope auf dem Arabis Mosaik Virus konnte aufgrund der unterschiedlichen Bindung verschiedener MCA an den gleichen Virusstamm geschlossen werden. Die unterschiedliche Reaktivität mit den ArMV-Stämmen bei der Untersuchung von 29 MCA, die gegen ArMV reaktiv waren, hat die Präsenz von mindestens 6 distinkten Epitopen an und im Viruspartikel gezeigt, wobei ein Epitop (Neotop) nur im intakten Viruspartikel vorhanden ist (Tab. 38). Diese Epitope sind jeweils bei mehr als einem Stamm vorhanden und erlauben daher die Zuordnung der untersuchten Stämme ArMV-ATCC, S, E und ivy zu einer serologischen Gruppe.

Tabelle 38: Antigene Determinanten von Arabis Mosaik Virus

Epitop Nr.	erkannt durch MCA→ArMV des Klons Nr.	ArMV-Stämme				
		S	E	ivy	ATCC	ATCC-P
1	20, 35	+	+	+	+	+
2	44	-	-	+	+	+
3	47	+	-	-	+	+
4	61	+	-	+	+	+
5	64	-	+	+	+	+
6	46	+	+	+	+	-

Reaktivität der MCA im ELISA (vergl. Tab. 37)

2. Reaktivität der MCA mit PLRV-Isolaten

Alle untersuchten MCA reagierten auch mit PLRV, jedoch keiner mit dem schweizer Isolat (PLRV-CH). Mit gemeinsamen Epitopen aller anderen Isolate reagierten 26 MCA. Mit allen Isolaten, ausser PLRV-710 reagierten 3 MCA, die dieses Isolat somit von den anderen unterscheiden konnten (Tab. 37, MCA-64). Mit den bisher untersuchten MCA konnte keine serologische Verwandtschaft zwischen PLRV-CH und den anderen, weltweiten PLRV-Isolaten festgestellt werden, obwohl man aufgrund der Kreuzreaktivität der polyklonalen Antiseren eine solche erwarten müsste.

Alle MCA reagierten am stärksten mit PLRV-720, sowie am schwächsten mit PLRV-710 (Tab. 37), aber auch mit PLRV-716 (MCA-30, 33) oder PLRV-723 (MCA-31, 66). Aufgrund der unterschiedlich hohen $Ext._{405nm}$ der einzelnen MCA mit einem PLRV-Isolat wurde auf unterschiedliche Affinität und/oder Epitop-Spezifität der MCA geschlossen. Die geringste Reaktivität mit den PLRV-Isolaten (Tab. 37) hatten MCA-62 und 64.

3. Reaktivität der MCA mit TMV und TMVP

Alle MCA zeigten Kreuzreaktivität mit TMV und TMVP, wobei die $Ext._{405nm}$ mit TMVP 1.4 - 4.0x grösser war als mit TMV. Die weitaus stärkste Reaktivität mit TMV und TMVP zeigten die MCA des Klons ArMV-62 (Tab. 37). Die Ursachen für diese Reaktivität sind vermutlich in einem Epitop mit einer ähnlichen Aminosäuresequenz im Protein dieser Viren zu suchen, müssen aber noch näher untersucht werden.

4. Spezifität der MCA

Anhand der gegen ArMV-ATCC gerichteten MCA konnten gruppenspezifische Epitope, sowie einzelnen Stämmen gemeinsame Epitope verschiedener ArMV-Stämme unterschieden werden und anhand dessen auf eine Zahl von mindestens 6 distinkten Epitopen des Viruspartikels geschlossen werden.

Diese MCA zeigten im ELISA sowohl mit TMV und TMVP als auch mit verschiedenen PLRV-Isolaten Kreuzreaktivität, d.h. sie sind gegen gemeinsame Epitope von 3 verschiedenen Virusgruppen angehörenden Pflanzenviren gerichtet.

IV. D I S K U S S I O N

Monoklonale Antikörper (MCA) gegen 3 pflanzenpathogene einzelsträngige RNA-Viren, die verschiedenen Virusfamilien angehören, konnten *in vitro* in Hybridomakulturen hergestellt, gereinigt und charakterisiert werden.

Bei 14 erfolgreichen Zellfusionen wurden mehr als 160 stabile virus-spezifische Antikörper-sekretierende und kontinuierlich in Kultur wachsende Hybridoma-Klone erhalten. Aliquoten wurden in flüssigem Stickstoff gelagert, um die Hybridoma-Klone und damit die Fähigkeit zur Produktion definierter, homogener monoklonaler Antikörper (MCA) zu konservieren.

Als Vertreter der stäbchenförmigen, genetischen Einkomponentenviren war Tabak Mosaik Virus (TMV), das zur Familie der Tobamoviren zählt, als isometrisches Einkomponentenvirus das Kartoffel Blattroll Virus (PLRV), das zur Familie der Luteoviren zählt, sowie als isometrisches Mehrkomponentenvirus Arabis Mosaik Virus (ArMV), das zu Familie der Nepoviren zählt, bearbeitet worden.

Im Vergleich mit den Resultaten anderer Autoren (Nowinski *et al.*, 1979; Gurney *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1981), die 5-10% spezifische Hybridomas erhielten, ist der in der vorliegenden Arbeit erhaltene durchschnittliche Anteil von 54.5% TMV-Ak-positiven Hybridoma-Kulturen an der Gesamtzahl wachsender Hybridomas aus 10 Zellfusionen(Tab. 19) sehr hoch.

Dies erklärt sich aus der Verwendung von hoch gereinigten Viruspräparationen zur Immunisierung der Mäuse.

Die Häufigkeit gebildeter Hybridomas, die virusspezifische Antikörper sekretieren, in der Fusionsmischung ist direkt korreliert mit dem Anteil Ak-bildender Zellen in der Milz immunisierter Tiere (Hämmerling & Hämmerling, 1981). Um eine maximale Zahl von virusspezifische-Ak-sekretierenden Zellen in der Milz immunisierter Mäuse zu erhalten, wurde ein optimierter Immunisierungsmodus und hoch gereinigte Virionen in hohen Konzentrationen eingesetzt (Dietzgen, 1981; Dietzgen & Sander, 1982) und nur die Maus zu einer Zellfusion verwendet, die den höchsten virusspezifischen Ak-Titer und damit verbunden die grösste Milz hatte.

Obgleich auch grob gereinigte Viruspräparationen zur Immunisierung verwendet werden können, konnte durch die Entfernung kontaminierender Proteine die Zahl virusdeterminierter Milzzellen und damit verbunden auch die Zahl virusspezifische-Ak-sekretierender Hybridomas nach der Zellfusion erhöht werden. Damit wurde gleichzeitig auch die Wahrscheinlichkeit erhöht, nicht nur MCA gegen immunodominante Epitope zu erhalten, sondern auch Hybridomas aufzufinden, die Ak gegen nur wenig vertretene Epitope produzieren, die jedoch zu einer umfassenden Strukturanalyse des Antigens notwendig sind.

Der durchschnittliche Anteil virusspezifische-Ak-sekretierender Hybridomas betrug bei ArMV nach 4 Fusionen 11.6%, bei PLRV nach 5 Fusionen 18.6% (Tab. 22, 23) und lag damit 3-5x niedriger als mit TMV, aber immer noch 2-3x höher wie bei anderen Autoren (Nowinski *et al.*, 1979; Gruney *et al.*, 1980). Dieser geringere Anteil erklärt sich aus der geringeren zur Verfügung stehenden Virusmenge zur Immunisierung (TMV: 4-6 mg, im Gegensatz zu ArMV: 300 µg und PLRV: 400-500 µg/Maus), sowie unterschiedlich starker Immunogenität der Viren (vergl. Ergebnisse 5).

Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde als Bindungstest zum Nachweis von Antigenen und Antikörpern während der gesamten Arbeit verwendet, da er schnell durchführbar ist, vielseitige Variationsmöglichkeiten bietet und hohe Empfindlichkeit erreicht. Diese Eigenschaften sind entscheidend zum schnellen Auffinden von Hybridomas, die die gewünschten AK produzieren und damit kritisch für die ganze Hybridoma-Technik. Der ELISA erlaubte es mit hoher Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit bei einer Vielzahl von Proben unabhängig vom Isotyp der produzierten Ak die Antigen-Spezifität festzustellen. Um dies zu erreichen, waren die Parameter des ELISA zum Nachweis von Ak im Serum immunisierter Tiere, in den Kulturüberständen von Hybridoma-Kulturen, sowie von angereicherten oder affinitäts-chromatographisch gereinigten MCA, zur Bestimmung ihrer Spezifität, der jeweiligen Problemstellung entsprechend optimiert worden (Methoden 2.7).

Für die MCA wurde eine Nachweisbarkeitsgrenze von 3-6 ng/ml erzielt, d.h. 0.6-1.2 ng Ak in 200 µl der im ELISA üblichen Probenmenge (Tab. 20, 26). Dies erhöhte nicht nur die Wahrscheinlichkeit der Auffindung von Ak-sekretierenden Hybridomas, sondern erleichterte auch die Charakterisierung der MCA anhand ihrer Reaktivität. Reaktivität und Spezifität der untersuchten MCA wurden anhand des ELISA definiert.

Die Produktion von MCA *in vitro* unter kontrollierten Bedingungen durch in Kulturmedium kontinuierlich wachsende Hybridomas erlaubte die wohl reinste Herstellung monoklonaler Antikörper (Hämmerling & Hämmerling, 1981).

Als Ascites in Mäusen wachsende Hybridomas ergeben zwar 1 000x höhere MCA-Titer im indirekten ELISA (Halk *et al.*, 1982b; Hsu *et al.*, 1983c) und 100 - 1 000x höhere Ausbeuten (Nowinski *et al.*, 1979; Oxford, 1982), jedoch besitzen diese MCA meist geringere spezifische Aktivität (Lee *et al.*, 1981) und enthalten oft eine unbekannte Menge kontaminierender Mäuse-Ak unbekannter und eventuell kreuzreagierender Spezifität (Underwood *et al.*, 1983).

Um optimales Wachstum der Hybridomas zu erreichen, wurde dem Kulturmedium 10-20% fötales Kälberserum (FCS) zugesetzt. Nach Anreicherung der MCA aus den Kulturüberständen der Hybridomas um den Faktor 3 (70% der Proteine wurden nicht präzipitiert) durch Präzipitation der Globuline mit 50% gesättigtem Ammoniumsulfat, wurden neben den Maus-MCA auch Globuline des zugesetzten Serums, darunter auch bovines Immunoglobulin (Ig), ko-präzipitiert.

Der nach der Reinigung dieser präzipitierten Globuline durch Affinitäts-Chromatographie an einer Protein A - Sepharose-Säule eluierte Peak (Abb. 13, Peak II) enthielt demnach neben den monoklonalen Maus-IgG auch Protein A - reaktive bovine Immunoglobuline (PA-Ig). Diese stören bei der Charakterisierung der MCA zwar nicht, sollten aber vor der Kopplung mit Enzym für den ELISA zum Virusnachweis entfernt werden.

Kommerzielles FCS enthält 60-260 µg bovines PA-Ig. Bei Verwendung von 10% dieses FCS im Medium und einem Ertrag von 10-20 µg MCA/ml durch in diesem Medium wachsende Hybridomas, entspricht dies einem Anteil von 25-70% der gesamten PA-Ig, die den eluierten "MCA-Peak" ausmachen (Underwood *et al.*, 1983).

Um diesen Anteil zu verringern, wurden die Hybridomas 4 Tage vor der Isolierung der MCA nur noch mit Serumfreiem Medium gefüttert.

Aufgrund der 1.5 - 100x höheren Affinität der Maus-IgG zu Protein A, wäre es denkbar, bei grossen Unterschieden der Gleichgewichtskonstanten die IgG der beiden Tierspezies an Protein A - Sepharose zu trennen.

Der jeweilige Anteil kontaminierender boviner Ak an den jeweils "gereinigten MCA" hängt ab von den relativen Affinitätskonstanten von Maus-MCA und bovinem IgG für Protein A, der Gesamtmenge IgG, sowie der Menge und dem Gehalt von PA-Ig des zugesetzten FCS.

Eine Möglichkeit diese Kontamination zu vermeiden, wäre die Verwendung von rein synthetischen, Serumfreien Kulturmedien, wie sie seit neuestem angeboten werden. Solche Medien sind mit definierten Substanzen wie Insulin, Transferrin, Lipiden, Aminosäuren u.a. ergänzt (Chang *et al.*, 1980; Fazekas de St. Groth, 1983), können jedoch aufgrund der unterschiedlichen Ansprüche der jeweiligen Zellinie nur bedingt eingesetzt werden.

Um bei Verwendung von FCS die Kontamination der MCA durch bovines IgG in Zukunft zu vermeiden, soll von PA-Ig befreites, IgG-freies FCS verwendet und die Reinigung der MCA durch Affinitäts-Chromatographie an mit Ziege- oder Kaninchen-anti Maus-Ig gekoppelter Sepharose durchgeführt werden. Letzteres hat den zusätzlichen Vorteil, dass alle MCA, unabhängig von ihrem Isotyp (Ig-Klasse und -Subklasse) gereinigt werden können.

Die Kontaktzeit der Ig beim Auftragen von purem oder angereichertem Kulturüberstand auf die Protein A - Sepharose-Säule betrug 15-20 min und ermöglichte damit die Gleichgewichtsbindung aller vorhandenen Maus-IgG, wogegen nach dieser Zeit erst 70% der bovinen IgG gebunden waren (Underwood *et al.*, 1983).

Um die gesamten an Protein A gebundenen MCA zu eluieren wurde 0.1 M Essigsäure, pH 2.6 verwendet, wobei die MCA möglichst kurz diesem niedrigen pH ausgesetzt wurden, um Denaturierung und Aktivitätsverlust zu verhindern (Schreier *et al.*, 1980).

Der bei der Elution erhaltene Peak III (Fig. 13) enthält wahrscheinlich einen Teil der bovinen PA-Ig, da nach Ergebnissen von Underwood *et al.* (1983) die bovinen PA-Ig in zwei distinkten Peaks bei pH 7.5-5.0 (70%) und pH 5.0-3.0 (30%) eluierten.

Die in die Kulturüberstände sekretierten MCA erreichen mit 1-46 µg/ml die gleiche Konzentration, wie sie für Vertebraten-virus-spezifische MCA von anderen Autoren beschrieben wurden (Nowinski *et al.*, 1979; Lee *et al.*, 1981; Scharff & Roberts, 1981).

Um höhere Ausbeuten an sekretierten MCA durch in grossem Maßstab in Kulturmedium wachsende Hybridomas zu erreichen, müssen die Zellen unter gleichbleibenden Wachstumsbedingungen in einem Cytostat kultiviert werden, wo kontinuierlich aufgrund hoher Zellkonzentrationen mehr MCA produziert werden können (Feder & Tolbert, 1983; Fazekas de St. Groth, 1983).

Die in der vorliegenden Arbeit hergestellten MCA erwiesen sich als sehr empfindlich und wurden teilweise durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen inaktiviert.

Sie zeigten sich gegenüber Veränderungen des pH sensitiv und verloren ihre Aktivität, wenn sie gereinigt in geringen Konzentrationen (<50 µg/ml) ohne Zusatz von Trägermolekülen, wie RSA, längere Zeit bei 4°C gelagert wurden, was auch von anderen Autoren beschrieben wird (Goding, 1980; Schreier *et al.*, 1980; Ciocca *et al.*, 1983, Hsu *et al.*, 1983b).

Zur Anwendung von MCA zur Bestimmung der Virusstruktur, Diagnose von Viren oder Trennung und Reinigung von Viren und Virusproteinen ist es notwendig, diese homogenen, gegen eine einzige antigene Determinante eines Antigens gerichteten MCA definierter, konstanter Eigenschaften möglichst vollständig zu charakterisieren. Dabei sollten Eigenschaften wie Epitop-Spezifität, Ig-Klasse, Affinität, spezifische Aktivität und biologische Funktion bestimmt werden. Nur so lassen sich die mit den MCA erhaltenen Ergebnisse interpretieren und für die jeweiligen Zwecke MCA mit geeigneten Eigenschaften auswählen. So sind für die Reinigung viraler Proteine MCA mit geringer Affinität wünschenswert, die eine schonende Elution erlauben, wogegen für Bindungstests zur Virusdiagnose, wie ELISA und RIA, MCA mit hoher Affinität von Vorteil sind.

Zur umfassenden Strukturermittlung des viralen Hüllproteins sollten so viel unterschiedliche MCA wie möglich, sowohl gegen schwache als auch gegen immunodominante Epitope hergestellt werden (Yedwell & Gerhard, 1981). Um diesem Ziel nahe zu kommen, wurden mehrere Fusionen durchgeführt und nach Hybridomas gesucht, die mit dem Nukleokapsid und/oder dem Hüllprotein reagieren. Bei Verwendung anderer Immunisierungsmethoden und Konzentrationen war es dennoch möglich, wiederum andere Spezifitäten zu erhalten (Briand *et al.*, 1982).

Art und Vielfalt der Spezifitäten der erhaltenen MCA scheinen vom Immunisierungsmodus und der zur Immunisierung eingesetzten Virusmenge beeinflusst zu sein.

Die Spezifität der isolierten MCA wurde, um den breitesten Bereich von serologisch verwandten Viren erfassen zu können, in einem indirekten ELISA bestimmt (Koenig, 1981; van Regenmortel & Burckard; 1980). Beim Vorliegen gereinigter, definierter Viren wurden diese an die Testplatten adsorbiert. Wenn keine gereinigten Viruspräparationen zur Verfügung standen wurden, um unspezifische Reaktionen zu vermeiden, die Viren aus infiziertem Pflanzensaft mit zuvor an die Testplatten gebundenen virusspezifischen polyklonalen Antiseren gebunden. Alle zur Bestimmung der Spezifität verwendeten viralen Antigene wurden aber jeweils im gleichen Testsystem untersucht, d.h. die Spezifität der MCA gegen TMV durch Adsorption der gereinigten Virionen und die Spezifität der MCA gegen ArMV und PLRV, da viele Virusstämme nicht gereinigt vorlagen, durch Bindung der Virionen an Ak-vorbeschichtete Testplatten. Dafür wurden Antiseren verwendet, von denen durch Vorversuche bekannt war, dass sie mit allen verwendeten ArMV-Stämmen bzw. PLRV-Isolaten reagierten.

Bei der Bestimmung des Immunoglobulin-Isotyps traten gelegentlich Mischungen von κ- und λ-leichten Ketten auf (7.1; 8.1). Diese sind wahrscheinlich auf eine begrenzte Heterogenität der MCA zurückzuführen (Williams , 1978; Nowinski *et al.*, 1979).

Die mit dem "ELISA zum Nachweis von Antikörpern" bei der Reaktivität mit verschiedenen viralen Antigenen erhaltenen Werte reflektieren die Quantität und Affinität der Antikörper (Avrameas, 1983), was bei den MCA aufgrund ihrer Homogenität besonders deutlich wurde.

Um ein Mass der Sekretionseffizienz der Hybridomakulturen zu erhalten, wurde zunächst die Konzentration der MCA gegen TMV in den Hybridoma-Kulturüberständen und nach der Anreicherung durch Präzipitation mit Ammoniumsulfat, anhand von Eichkurven geschätzt. Diese waren mit monospezifischen, polyklonalen Antikörpern im jeweils gleichen ELISA-System erstellt worden (Abb. 11, 15). Die so aufgrund der MCA-Reaktivität im ELISA geschätzten Konzentrationen lagen 100 - 10 000x niedriger als die anhand des Extinktionskoeffizienten für IgG berechneten Konzentrationen der gereinigten MCA. Dies erklärt sich aus der Empfindlichkeit des "ELISA zum Ak-Nachweis" gegenüber der Avidität und Affinität der Antikörper, wobei der Ak-Nachweis durch die Affinität der MCA entsprechend dem Massenwirkungsgesetz beeinflusst wird (Lehtonen & Eerola, 1982).

Antikörper mit geringer Affinität lösen sich während der Waschvorgänge im ELISA ab. Aufgrund dessen korreliert der ELISA nicht mit geringen Affinitäten. Deshalb zeigten MCA mit geringer Affinität nur geringe Reaktivität im ELISA, die sich nicht mit der Konzentration der MCA korrelieren liess. Im Gegensatz dazu wurden von den monospezifischen, polyklonalen Ak hauptsächlich hochaffine Ak gebunden. Mit steigender Affinität der MCA war der Unterschied zwischen der aufgrund der Reaktivität im ELISA geschätzten und der gemessenen Konzentration gereinigter MCA immer geringer (vergl. Ergebnisse 7.2).

Monoklonale Antikörper gegen TMV

Die Antigen-Spezifität der hergestellten MCA wurde festgestellt und daraus auf die antigene Struktur der Epitope von TMV geschlossen.

Die Immunisierung von Mäusen mit intakten Viruspartikeln induzierte Antikörper, die gegen Epitope des Nukleokapsids und der Proteinmonomeren (TMVP) gerichtet waren, was anhand der Reaktivität der MCA mit dem Nukleokapsid von TMV und/oder TMVP im ELISA festgestellt wurde.

Um sicher zu stellen, dass nur Monomere des Hüllproteins im ELISA verwendet wurden, wurde TMVP in Konzentrationen von weniger als 50 µg/ml und in Coating Puffer pH 9.6 verwendet. Unter diesen Bedingungen geringer Konzentration und Ionenstärke liegt TMVP in monomerer Form vor und sich leicht bildende Aggregate, die zum Verdecken von Epitopen führen können, sind vollständig dissoziiert (Klug & Durham, 1971; van Regenmortel & Lelarge, 1973; van Regenmortel, 1982).

Einige der MCA reagierten mit Epitopen, die sowohl im Nukleokapsid als auch in den Proteinmonomeren exponiert waren, also in ähnlicher Konformation sowohl an der Oberfläche von TMVP als auch von TMV zugänglich waren.

Andere MCA reagierten mit Epitopen, die ausschliesslich im Nukleokapsid vorhanden waren und auf der Oberfläche der Proteinmonomere fehlten (vergl. Abb. 19). Solche Neotope können durch die räumliche Nähe von Aminosäuresequenzen aus benachbarten Protein-Untereinheiten in der Quartärstruktur erklärt werden oder entstehen durch Konformationsänderungen am Proteinmonomer durch Bindungen zwischen den Untereinheiten im Nukleokapsid (Milton & van Regenmortel, 1979).

Sie wurden bei TMV mit MCA festgestellt (Dietzgen & Sander, 1982) und bei stäbchenförmigen und sphärischen Pflanzenviren aus allen Taxa gefunden, jedoch mit polyklonalen Antikörpern (van Regenmortel & Lelarge, 1973).

Abb. 19: Modellzeichnung eines TMV-Partikels

Ausschnitt des TMV-Nukleokapsids mit der internalen RNA-Helix und den externalen Proteinmonomeren. (Klug & Caspar, 1960).

Obwohl die Mäuse mit intakten Virionen immunisiert wurden, traten auch monoklonale Antikörper auf, die ausschliesslich mit den Monomeren des Hüllproteins und nicht mit dem Nukleokapsid reagierten. Wahrscheinlich enthalten selbst CsCl-Dichtegradienten gereinigte TMV-Präparationen Proteinmonomere. Diese Annahme basiert auf der Beobachtung von Milton und van Regenmortel (1979), dass in hoch gereinigten TMV-Präparationen geringe Mengen von Monomeren spontan vom Nukleokapsid freigesetzt werden.

Dies geschieht möglicherweise aufgrund der Metastabilität der "letzten Lagen" (vergl. Abb. 19) von Kapsidmonomeren des Nukleokapsids (van Regenmortel, 1982). So ist also anzunehmen, dass sowohl in den für die Immunisierung benutzten Virus-Präparationen als auch durch Abbau des Nukleokapsids im immunisierten Tier, Epitope der Monomere des Hüllproteins zur Antikörper-Bildung führten (Dietzgen & Sander, 1982).

Auf der Basis des für TMV angenommenen Multideterminanten-Modells befindet sich auf der Oberfläche des Hüllproteins von TMV (TMVP) eine definierte Anzahl distinkter Epitope, die aufgrund ihrer Zugänglichkeit für polyklonale Ak festgestellt worden waren (van Regenmortel & Lelarge, 1973; Milton & van Regenmortel, 1979). Demnach wären die ausschliesslich mit TMVP reagierenden MCA gegen solche Epitope gerichtet, die auf der Oberfläche der Protein-Monomere vorkommen, jedoch im Nukleokapsid verdeckt oder verändert sind.

Auch bei Vertebraten-pathogenen Viren, wie Mäuse-Leukämie-Viren und Maul-und-Klauenseuche-Virus, wurden solche Beobachtungen gemacht (Nowinski *et al.*, 1979; McCullough & Butcher, 1982).

Aufgrund der unterschiedlichen Bindung von MCA an TMVP (Tab. 27) konnte auf das Vorhandensein von mehreren getrennten Epitopen geschlossen werden (Yedwell & Gerhard, 1981) und das anhand von Untersuchungen mit polyklonalen Ak erstellte Multideterminanten-Modell bestätigt werden.

Die untersuchten TMV-Stämme *vulgare, dahlemense* und Holmes'Ribgrass verfügen über gemeinsame Epitope (einen gemeinsamen Epityp), da die gegen TMV *vulgare* hergestellten MCA auch mit dem Nukleokapsid und/oder den Protein-Monomeren der anderen Stämme reagierten (Tab. 27).

Im Gegensatz zu Briand *et al.* (1982), die zur gleichen Zeit MCA gegen TMV, allerdings nach anderem Immunisierungsmodus hergestellt hatten, wurden in der vorliegenden Arbeit keine MCA festgestellt, die ausschliesslich mit stammspezifischen Epitopen einzelner TMV-Stämme reagierten. Dies deutet darauf hin, dass nicht alle relevanten Spezifitäten erhalten wurden und daher nur ein Teil der gesamten Antigenität von TMV mit den vorliegenden MCA abgedeckt werden konnte (vergl. Yewdell & Gerhard, 1981).

Es genügt also scheinbar nicht, die Diversität der MCA-Spezifität allein durch eine erhöhte Zahl von Zellfusionen zu vergrössern. Es müssen zusätzlich unterschiedliche Immunisierungsmodi einbezogen werden, um wie in dieser Arbeit und bei Briand *et al.* (1982), eine Palette von MCA verschiedener Epitop-Spezifität zu erhalten.

Mit den von Briand *et al.* (1982) hergestellten, stammspezifischen MCA erkannte der indirekte ELISA keine der Tobamoviren, die sich in ihrem mit polyklonalen Ak bestimmten Serologischen Differenzierungs-Index (SDI) (van Regenmortel, 1982) um mehr als 2.0 unterschieden. So wurde z.B. TMV-HR (SDI = 2.1) nicht erkannt. Ebenfalls wurden keine gruppenspezifischen MCA von Briand *et al.* (1982) erhalten, möglicherweise aufgrund der geringen Zahl von Fusionen (2) und untersuchten MCA (9). Möglicherweise führt die subcutane Immunisierung mit grossen Virusmengen (4-6 mg/Maus), wie sie in der vorliegenden Arbeit mit TMV durchgeführt wurde, bevorzugt zur Bildung von Ak gegen gruppenspezifische Epitope, wogegen die intramuskuläre und intraperitoneale Immunisierung mit geringeren Virusmengen (0.7 mg/Maus) zur Produktion von Ak gegen stammspezifische Epitope führt.

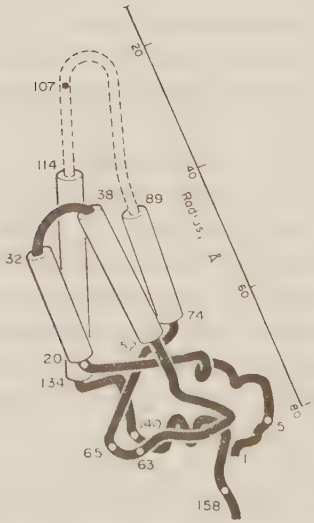
Mit den in dieser Arbeit hergestellten gruppenspezifischen oder für 2 Stämme spezifischen MCA war es möglich, auch TMV-HR im indirekten ELISA zu erkennen. Aufgrund unterschiedlich starker Reaktivität einzelner MCA mit dem Nukleokapsid und/oder den Protein-Monomeren der TMV-Stämme waren Differenzierungen möglich. Dadurch konnten sowohl einzelne wie auch mehrere TMV-Stämme und deren Hüllprotein-Monomere unterschieden werden. Der Grund für die unterschiedlich starke Reaktivität der MCA mit dem Nukleokapsid oder den Protein-Monomeren verschiedener Stämme dürfte in leicht veränderten immunochemischen Eigenschaften einzelner Epitope liegen. Diese Veränderung kann in Aminosäureaustauschen im Epitop selbst oder in anderen Bereichen des Hüllproteins begründet sein, die eine im Vergleich zu TMV *vulgare* leicht veränderte Konformation des Epitops zur Folge hat. Solche leichten Veränderungen der Konformation können zur besseren oder schlechteren Bindung dieses MCA an die gleiche antigene Determinante führen.

Ebenfalls kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine im Vergleich zu TMV *vulgare* unterschiedliche Aminosäuresequenz zu anderer Ladungsverteilung im Hüllprotein führt, die möglicherweise zur bevorzugten Adsorption anderer Protein-Regionen an die Oberfläche der Mikrotiterplatten führt und damit die Zugänglichkeit zu einem Epitop verbessert oder verschlechtert.

Die gereinigten MCA zeigten aufgrund unterschiedlicher Affinität im ELISA unterschiedliche spezifische Aktivität (Tab. 30). Diese unterschied sich auch für TMV und TMVP, was auf unterschiedliche Zugänglichkeit hindeutet, die an etwas abweichender Konformation der entsprechenden Epitope liegen mag.

Die antigene Struktur von TMV konnte bisher aufgrund der durch Röntgenkristallographie bei 2.8 Å Auflösung (Bloomer *et al.*, 1978) bestimmten 3-dimensionalen Struktur des TMVP-Monomers (Abb. 20; Milton *et al.*, 1980), sowie Untersuchungen mit polyklonalen Antikörpern (van Regenmortel, 1981; Altschuh & van Regenmortel, 1982; Altschuh *et al.*, 1983) charakterisiert werden.

Abb. 20: Schematische Darstellung der Faltung des TMV-Protein-Moleküls



Die Zeichnung der 3-dimensionalen Struktur des TMVP-Monomers basiert auf den Röntgenchristallographie-Daten von Bloomer *et al.* (1978) bei einer Auflösung von 2.8 Å. Die helicalen Bereiche sind als Zylinder dargestellt (Milton *et al.*, 1980).

Anhand der Ergebnisse mit der Hemmung des ELISA und der Hemmung der Complement-Fixierung mit tryptischen und synthetischen Peptiden von TMVP konnten mit polyklonalen Antiseren bisher 7 antigene Determinanten der Protein-Untereinheit von TMV lokalisiert werden, davon je eine im N-terminalen Bereich (Aminosäurereste 1-10) und im C-terminalen Bereich (Aminosäurereste 153-158) von TMVP (Abb. 20). Diese beiden Epitope sind ebenfalls an der Oberfläche des Nukleokapsids zugänglich.

Um die tatsächliche physikalische Struktur und Aminosäuresequenz der Epitope zu erfassen und damit gleichzeitig die Epitop-Spezifität der gegen sie gerichteten MCA zu bestimmen, sollte die Reaktivität der MCA mit isolierten Peptiden aus dem nativen TMVP und synthetisierten Peptiden untersucht werden. Dazu wurden für erste Experimente Peptide bevorzugt, die in hoch zugänglichen Regionen von TMV und TMVP, wie den N- und C-terminalen Enden von TMVP (vergl. Abb. 20), lokalisiert sind (Anderer *et al.*, 1967; Milton & van Regenmortel, 1979).

Durch Spaltung von TMVP mit Trypsin wurden native Peptide erhalten. Das N-terminale tryptische Peptid (Aminosäurereste 1-41) konnte in zufriedenstellender Menge und Reinheit isoliert, identifiziert und die serologische Aktivität mit polyklonalen Antikörpern gegen intaktes TMV festgestellt werden (Methoden 2.4.2; Ergebnisse 2.2). Von den bisher untersuchten MCA konnten jedoch noch keine identifiziert werden, die gegen Epitope des N-terminalen Bereichs von TMVP gerichtet waren. Die Überprüfung weiterer MCA sowie Bindungsexperimente mit den anderen löslichen Peptiden von TMVP zur direkten Bestimmung der Lage der Epitope, gegen die die hergestellten MCA gerichtet sind, steht noch aus. Erste Ergebnisse der dazu nötigen präparativen Reinigung der löslichen tryptischen Peptide durch HPLC zeigten befriedigende Ansätze.

Zur chemischen Synthese wurde die C-terminale Region von TMVP ausgewählt, da aufgrund früherer Arbeiten mit synthetischen Peptiden und polyklonalen Antikörpern bekannt war, dass die Aminosäurereste 153-158 (Abb. 20) eine antigene Determinante darstellen (Anderer & Schlumberger, 1965; Anderer & Ströbel, 1972). Da 4-5 Aminosäuren ausreichend sind, um eine antigene Determinante zu definieren (Sela, 1969; Benjamini *et al.*, 1972), wurde das C-terminale Tetrapeptid des Hüllproteins von TMV *vulgare* (TMVP) chemisch synthetisiert und dazu klassische Methoden verwendet, um höchste Reinheit zu gewährleisten.

Die Untersuchung der Reaktivität von Antikörpern mit dem synthetischen Tetrapeptid im ELISA durch Beschichtung der Testplatten mit den isolierten Peptiden, ergab aufgrund der geringen Beschichtungseffizienz nur bei hohen Peptidkonzentrationen messbare Extinktionen (Tab. 18). Als Ausweg boten sich die kovalente Bindung der Peptide an mit Glutaraldehyd aktivierte Polystyrolplatten (Klasen *et al.*, 1983), Inhibitionstests, d.h. Hemmung des ELISA mit den Peptiden (Altschuh & van Regenmortel, 1982), sowie die Kopplung der Peptide in der nativen Konformation an polymere Träger an.

Dieses letzte Verfahren wurde hier verwendet. Die Reaktivität der Konjugate mit polyklonalen Ak gegen TMV wurde im direkten und indirekten ELISA bestimmt. Die dazu verwendeten polyklonalen Ak waren durch Immunisierung mit intakten TMV-Partikeln hergestellt worden und enthielten Ak gegen den C-terminalen Bereich von TMVP (Anderer & Ströbel, 1972). Diejenigen Konjugate mit einer definierten Anzahl von Peptidsubstituenten die dabei die höchste Reaktivität zeigten, wurden zur Untersuchung der Reaktivität von MCA ausgewählt.

Monoklonale Antikörper von 4 Hybridoma-Klonen konnten aufgefunden werden, die gegen das im C-terminalen Bereich von TMVP gelegene Epitop, das die Aminosäuresequenz Gly-Pro-Ala-Thr des synthetischen Peptids darstellt oder beinhaltet (Tab. 31) gerichtet waren.

Durch die Reaktivität der gegen das C-terminale Tetrapeptid von TMVP gerichteten MCA nicht nur mit dem homologen Stamm *vulgare*, sondern auch mit den Stämmen *dahlemense* und Holmes'Ribgrass (Tab. 27) konnte gezeigt werden, dass bei diesen Stämmen ein gemeinsames, äquivalentes Epitop in diesem Bereich vorhanden ist. Die Vermutung von van Regenmortel (1981), dass die Protein-Untereinheiten aller TMV-Stämme eine ähnliche Tertiärstruktur besitzen, so dass auch äquivalente Regionen beim Hüllprotein verschiedener Stämme jeweils antigene Determinanten darstellen, konnte schon für die Stämme *vulgare* und U2 nachgewiesen werden (Altschuh & van Regenmortel, 1982). Mit MCA konnnte dies nun auch für die Stämme *dahlemense* und Holmes'Ribgrass anhand der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Die Bindungsfähigkeit der MCA an das C-terminale Tetrapeptid dieser Stämme wurde durch die Tatsache ermöglicht, dass trotz etwas veränderter Aminosäuresequenz, die in den Positionen 155 bzw. 158 ausgetauschten Aminosäuren die gleichen funktionellen Gruppen, ähnliche Polaritäten und Grösse haben. Somit können diese Sequenzen von der gleichen Antigen-Bindungsstelle (Paratop) eines Antikörpers erkannt und gebunden werden, was letztlich die gemeinsame antigene Determinante ausmacht und die Kreuzreaktivität erklärt (Tab. 39).

Tabelle 39: C-terminale Aminosäuresequenz der TMV-Stämme *vulgare* (TMV) *dahlemense* (*d*) und Holmes'Ribgrass (HR)

TMV-Stamm	C-terminale Aminosäuresequenz
TMV	Gly-Leu-Val-Trp-Thr-Ser-Gly-Pro-Ala-Thr
d	" " " " " " Ala-Pro-Ala-Ser
HR	- " -Pro- " " " Ala-Pro-Ala-Thr

(van Regenmortel, 1981)

Die relativ freie Rotation des C-terminalen Endes von Proteinen, das vermutlich wie eine Art Hapten in flexibler Konformation an den Rest des Moleküls gebunden ist, erhöht die strukturelle Ähnlichkeit des nativen und synthetischen, gekoppelten C-terminalen Peptids (Lerner, 1982).

Das C-terminale Tetrapeptid von TMVP stellt ein sowohl in den Protein-Monomeren als auch im Nukleokapsid aller 3 Stämme an der Oberfläche gelegenes Epitop dar, da die dagegen gerichteten MCA sowohl mit TMVP als auch mit TMV reagieren (Tab. 27). Dies korreliert mit der vermuteten mobilen, nicht permanent fixierten Konformation dieses Bereichs von TMVP (Anderer & Ströbel, 1972; Milton & van Regenmortel, 1979), so dass die räumliche Struktur hauptsächlich durch das bei den Stämmen *vulgare*, *dahlemense*, HR und U2 unverändert an gleicher Position vorhandene Prolin (van Regenmortel, 1981; Tab. 39) bestimmt wird. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass der Austausch von Prolin bei einer TMV-Mutante zu Veränderungen der Konformation und der serologischen Reaktivität führte (Milton *et al.*, 1980).

Erstmals konnte mit monoklonalen Antikörpern die quantitative Untersuchung der Neutralisation der Virus-Infektiosität durchgeführt werden. Hierbei wurde das C-terminale Tetrapeptid von TMVP als kritische Region (Neutralisationsdeterminante) auf dem TMV-Partikel durch die spezifische Blockierung mit nur gegen dieses Epitop gerichteten MCA nachgewiesen.

Damit konnten Ergebnisse mit polyklonalen Antiseren gegen Konjugate synthetischer Di-Hexapeptide der C-terminalen Aminosäuresequenz von TMVP, die zur Neutralisation der Infektiosität von TMV führten, (Anderer & Schlumberger, 1965; Benjamini *et al.*, 1972) untermauert werden.

Von den 3 auf ihre neutralisierende Aktivität hin untersuchten, gegen die C-terminale Region von TMVP gerichteten MCA der Klone TMV-11, 62 und 95 (Tab. 31), führten nur die MCA des Klons TMV-95 zum Verlust der Infektiosität von TMV. Dieser Klon hat eine sehr hohe spezifische Aktivität für dieses Epitop (Tab. 30) und führt möglicherweise zur Stabilisierung des viralen Kapsids und damit zur Hemmung des "uncoating" (allosterisches Transitions-Modell; van Regenmortel, 1982).

Die anderen MCA führten zu einer im Vergleich zur Wirkung unspezifischer Proteine um 25-30% verminderten Hemmung der Infektiosität (Tab. 33, 34). Aufgrund der 48-76% höheren spezifischen Aktivität dieser MCA mit TMVP kann man vermuten, dass diese MCA an einen über das C-terminale Tetrapeptid hinausgehenden, im TMV-Nukleokapsid schlechter zugänglichen Bereich als bei den Protein-Monomeren binden. Die insgesamt geringere spezifische Aktivität dieser MCA (Tab. 30) führt damit möglicherweise zu einer nur schwachen Bindung an den C-Terminus des Hüllproteins im intakten Viruspartikel.

Sie konnten offensichtlich diesen Bereich zwar vor einer unspezifischen Inaktivierung durch andere Proteine schützen, reichten in ihrer Bindungsstärke jedoch nicht aus, um die Infektiosität der Virionen zu neutralisieren. Dies hatte letztlich eine Verbesserung der Infektiosität im Vergleich zur Kontrolle zur Folge.

Die mit polyklonalen IgG bestimmte Zahl der Stellen, an die auf einem TMV-Partikel Ak gleichzeitig binden können (antigene Valenz) entspricht 780 (van Regenmortel & Hardie, 1976). Um die Neutralisationsexperimente mit den MCA auswerten zu können und den notwendigen Überschuss von Ak-Molekülen zu gewährleisten, wurde als Grundlage für die Berechnung angenommen, dass diese Zahl grössenordnungsmässig auch für die Bindung von MCA gilt. Diese Annahme war notwendig, da bisher keine Angaben über die Valenz von TMV für homogene, nur gegen eine antigene Determinante des TMVP gerichtete Antikörper möglich waren. Da das TMV-Nukleokapsid aus 2130 identischen Protein-Untereinheiten aufgebaut ist (van Regenmortel, 1981), sollte die antigene Valenz eigentlich ein Vielfaches dieser Zahl, in Abhängigkeit von der Anzahl für Ak zugänglicher Epitope sein. Die mit polyklonalen IgG im Überschuss bestimmte Valenz von 780 deutet darauf hin, dass durch sterische Behinderungen der gegen verschiedene Epitope gerichteten Ak verhindert wurde, dass eine grössere Zahl dieser Ak-Moleküle gleichzeitig an der Virusoberfläche binden konnte. Monoklonale Antikörper, die gegen nur ein Epitop gerichtet sind, also nur eine Bindungsstelle pro Protein-Untereinheit vorfinden, ergeben möglicherweise durch geringere sterische Behinderungen eine grössere antigene Valenz von TMV, die der Zahl der Untereinheiten pro Partikel nahe kommt. Wenn die Valenz von TMV für MCA mit 2130 angenommen würde, wäre das Verhältnis der Antikörper-Moleküle: TMV-Moleküle (Tab. 32) jeweils um den Faktor 2 niedriger, würde die Aussagen jedoch nicht beeinflussen.

Die Ergebnisse der Neutralisationsexperimente zeigen, dass sowohl das Verhältnis virusspezifischer Ak zu nicht-spezifischen Proteinen in der Probe als auch ein Oberschuss von Ak-Molekülen bezüglich der Ak-Bindungsstellen am Viruspartikel (Valenz) äusserst wichtig für eine genaue Aussage sind.

Monoklonale Antikörper gegen ArMV

Das ArMV-Parikel besitzt eine multideterminante antigene Struktur. Auf das Vorhandensein mehrerer getrennter Epitope auf der Partikeloberfläche konnte aufgrund der unterschiedlichen Bindung verschiedener MCA geschlossen werden (Abb. 18, Tab. 37). Alle MCA reagierten im indirekten ELISA mit dem zur Immunisierung und zum Screening verwendeten ArMV-Stamm ATCC.

Die unterschiedliche Reaktivität der MCA ist in verschiedenen Epitop-Spezifitäten und Affinitäten begründet. Die MCA der IgG_1-Subklasse zeigten die höchste spezifische Aktivität und wurden daher zuerst charakterisiert.

Die ArMV-Stämme ATCC, S, E und ivy verfügen über gemeinsame Epitope (gemeinsamer Epityp), da die gegen ArMV-ATCC hergestellten MCA auch mit diesen Stämmen reagierten. Dabei wurden MCA aufgefunden, die gegen allen vier Stämmen gemeinsame, gruppenspezifische Epitope gerichtet waren, sowie andere MCA, die Epitope erkannten, die ausschliesslich bei 2-3 Stämmen vorhanden sind. Mit diesen MCA war es möglich, zwischen den ArMV-Stämmen zu differenzieren (Tab. 37).

Die Reaktivität mit den ArMV-Partikeln und dem isolierten Hüllprotein des Stammes ATCC wurde untersucht, um festzustellen, ob MCA erhalten wurden, die gegen Epitope gerichtet sind, die ausschliesslich auf dem Nukleokapsid oder dem isolierten Hüllprotein oder auch auf der Oberfläche von beiden vorhanden und exponiert sind.

Anhand der Reaktivität der MCA des Klons ArMV-46 (Tab. 38) konnte ein Epitop aufgefunden werden, das ausschliesslich auf der Oberfläche des intakten Nukleokapsids exponiert ist, im isolierten Hüllprotein von ArMV-ATCC jedoch fehlt. Solche Neotope konnten mit polyklonalen Antikörpern im viralen Nukleokapsid vieler sphärischer und stäbchenförmiger Pflanzenviren, wie TMV, Potato Virus X und Bromgrass Moasic Virus (von Wechmar & van Regenmortel, 1968), festgestellt werden. Neotope können durch Konformationsänderungen der Protein-Untereinheit durch Bindungen zwischen den Untereinheiten oder durch Zusammenlagerung von benachbarten Aminosäureresten verschiedener Untereinheiten entstehen (van Regenmortel, 1982; Quesmiaux *et al.*, 1983).

Monoklonale Antikörper gegen Epitope, die ausschliesslich auf den isolierten Protein-Untereinheiten exponiert sind (Cryptotope), wurden bei den bisher untersuchten MCA nicht gefunden. Dies dürfte auch schwierig sein, da sich vermutlich nach der Dissoziation der Viruspartikeln als stabilste Form Tetramere des Hüllpolypeptids (MG = 13 000 d) bilden (Chu & Francki, 1979; Murant, 1981) und damit wahrscheinlich Epitope der Protein-Monomeren verdecken.

Alle anderen MCA waren gegen Epitope gerichtet, die sowohl im Nukleokapsid als auch in den Protein-Untereinheiten an der Oberfläche zugänglich waren.

Untersuchungen anderer ikosaedrischer Viren, Bromgrass Mosaik Virus und Turnip Yellow Mosaic Virus, mit polyklonalen Antikörpern durch Immunodiffusion und Hemmung der Complement-Fixierung zeigten ebenfalls das Vorhandensein von mehreren Epitopen, die entweder ausschliesslich an der Oberfläche des Nukleokapsids oder der dissoziierten Protein-Untereinheiten, sowie an beiden Oberflächen exponiert sind (von Wechmar & van Regenmortel, 1968; Pratt *et al.*, 1980; Quesmiaux *et al.*, 1983).

Aufgrund der unterschiedlichen Reaktivität der untersuchten 29 monoklonalen Antikörper mit den ArMV-Stämmen konnte auf das Vorhandensein von mindestens 6 getrennten Epitopen auf dem Viruspartikel und/oder dem Hüllprotein von ArMV geschlossen werden (Tab. 38). Diese ArMV-Stämme ATCC, S, E und ivy wurden einer gemeinsamen serologischen Subgruppe der Nepoviren zugeordnet, da sie über mehrere gemeinsame antigene Determinanten verfügen. Diese Einordnung wird durch Untersuchungen mit polyklonalen Antikörpern unterstützt, die, im Gegensatz zu den meisten anderen Pflanzenviren, keine serologische Verwandtschaft zwischen Mitgliedern verschiedener Subgruppen von Nepoviren zeigten (Murant, 1981).

Zur genaueren Charakterisierung der antigenen Struktur von ArMV wären Informationen über die Aminosäuresequenz und Faltung des Hüllpolypeptids von Nutzen, sowie die Feststellung der Epitop-Spezifität der hergestellten MCA anhand der Reaktivität mit nativen und synthetischen Peptiden notwendig. Da die Spezifität zwischen Virusstamm und Nematodenvektor bei der Virusübertragung vermutlich von den Eigenschaften des Hüllproteins abhängt (Murant, 1981), sind auch in dieser Richtung noch interessante Ergebnisse zu erwarten.

Sowohl polyklonale Antiseren aus verschiedenen Quellen und aus verschiedenen Tierspezies, die durch Immunisierung mit gereinigtem ArMV oder PLRV hergestellt wurden als auch die hergestellten monoklonalen Antikörper gegen ArMV zeigten Kreuzreaktivität mit verschiedenen PLRV-Isolaten, ArMV-Stämmen, sowie TMV und TMVP.

Nur in wenigen Ausnahmefällen wurde bisher mit polyklonalen Antikörpern eine Kreuzreaktivität zwischen Viren innerhalb einer taxonomischen Gruppe festgestellt (van Regenmortel, 1982), jedoch noch nie zwischen den

Vertretern von 3 verschiedenen taxonomischen Gruppen, wie es in dieser Arbeit mit MCA gezeigt wurde.

Die MCA reagierten mit allen PLRV-Isolaten und mit unterschiedlicher Aktivität mit einem gegebenen Stamm, jedoch nicht mit dem schweizer Isolat (PLRV-CH), obwohl das polyklonale Antiserum der zur Fusion verwendeten Mäuse auch Antikörper gegen diesen Stamm enthielt. PLRV-CH ist daher zwar mit den weltweiten PLRV-Isolaten serologisch aufgrund der Kreuzreaktivität mit polyklonalen Antiseren verwandt, die gegen ArMV gerichteten, untersuchten MCA sind jedoch gegen keine gemeinsame Determinante mit PLRV-CH gerichtet.

Aufgrund der auch mit TMV und TMVP aufgefundenen Kreuzreaktivität erscheint die mit den MCA des Klons TMV-130 festgestellte geringe Kreuzreaktivität mit ArMV durchaus möglich (vergl. Tab. 28).

Da monoklonale Antikörper homogen sind, muss jede Kreuzreaktivität eine gemeinsame Spezifität (strukturelle Ähnlichkeit) widerspiegeln. Kreuzreagierende MCA erkennen gleiche Sequenzen und/oder Konformationen, die an der Oberfläche zugänglich sind, auch wenn keine Verwandtschaft der Moleküle besteht. So konnten Crawford *et al.* (1982) eine Kreuzreaktivität von MCA gegen Simian Virus 40 T-Antigen mit Wirtsproteinen zeigen.

Monoklonale Antikörper sind im engeren Sinn nicht unbedingt monospezifisch. Ein einzelnes Paratop hat die Fähigkeit mit verschiedenen Affinitäten an eine Reihe epitypisch "verwandter" Epitope zu binden. Das bedeutet jedoch nicht notwendigerweise, dass die kreuzreagierenden Antigene gemeinsamen Ursprung haben und zu einer taxonomischen Gruppe gehören (Yewdell & Gerhard, 1981; Oxford, 1982). Damit stellt sich die Frage, ob das Konzept der "serologischen Verwandtschaft" von Viren auch bei der Verwendung von monoklonalen Antikörpern noch aufrecht erhalten werden kann.

In den letzten 2 Jahren gelang es auch anderen Arbeitsgruppen monoklonale Antikörper gegen andere Pflanzenviren herzustellen.

So stellte die American Type Culture Collection MCA gegen Alfalfa Mosaic, Apple Mosaic, Carnation Etched Ring, Citrus Leaf Rugose, Citrus Variegation, Prunus Necrotic Ringspot, Tobacco Streak, Tulip Breaking und Barley Yellow Dwarf Viren her. Mit dem indirekten ELISA wurden sowohl stammspezifische, als auch zwei oder mehreren Stämmen gemeinsame Epitope entdeckt, wobei jeweils aber nur 5-7 MCA untersucht wurden. Zu Strukturuntersuchungen sind diese MCA nicht herangezogen worden (Halk *et al.*, 1982 a-c; HSU *et al.*, 1983 a-c; Halk & Franke, 1983).

Gegen Potato Virus Y gerichtete MCA, die in Kulturmedium hergestellt worden waren, reagierten unterschiedlich stark mit diesem Antigen. Einige dieser MCA waren gegen allen Substämmen oder mehreren Stämmen gemeinsame, andere gegen stammspezifische Epitope gerichtet. Bei Anwendung dieser MCA im ELISA war die Diagnose des Virus mit höherer Empfindlichkeit als mit polyklonalen Ak möglich (Gugerli,1982).

Um die Empfindlichkeit und Spezifität bei der Diagnose von Pflanzenviren durch die Verwendung von MCA erhöhen zu können, ist es wichtig, MCA mit bestimmten, für das Testsystem vorteilhaften Eigenschaften auszuwählen. Dazu sind jedoch Kenntnisse der Feinstruktur des Antigens, d.h. des Viruspartikels, unbedingt notwendig.

Kenntnisse dieser Art konnten in der vorliegenden Arbeit durch Untersuchungen mit MCA erhalten werden.

Diese Informationen über die Virusstruktur können dann zur Verwendung verschiedener hoch affiner MCA zum Beschichten der Testplatten im ELISA und zur Enzym-Markierung, sowie definierter Mischungen ("synthetische Antiseren") von MCA führen und zur Verbesserung der Empfindlichkeit und Spezifität des ELISA genutzt werden (Ehrlich *et al.*, 1982; Lutz *et al.*, 1983).

Im Hinblick auf die Anwendung der in dieser Arbeit hergestellten MCA zur Verbesserung der serologischen Diagnose von Pflanzenviren liegen bereits einige erfolgreiche Vorversuche vor.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Durch Zellfusion konnten in Kulturmedium wachsende Hybridomas hergestellt werden, die monoklonale Antikörper (MCA) gegen Tabak Mosaik Virus (TMV), Arabis Mosaik Virus (ArMV) und Potato Leafroll Virus (PLRV) sekretierten.

2. Um dies zu erreichen wurden TMV, ArMV und PLRV vermehrt, aus infizierten Wirtspflanzen isoliert und zum Entfernen von Pflanzenproteinen durch Zentrifugation gereinigt. Mit den hochgereinigten Präparaten der einzelnen Viren wurden, jeweils getrennt, verschiedene Mäuse mehrfach immunisiert, um möglichst hohe Antikörper-Titer zu erhalten.

3. Zum Nachweis von viralen Antigenen und virusspezifischen Antikörpern, sowie deren Reaktivität wurden verschiedene Testsysteme des Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) mit hoher Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit entwickelt.

4. Nach der Fusion von Milzzellen aus den hyperimmunisierten Mäusen mit Myelomzellen erhaltene virusspezifische-Antikörper-sekretierende Hybridoma-Kulturen wurden mehrfach durch limiting dilution kloniert und die Antikörper-Produktion jeweils mit dem ELISA geprüft.

5. Hybridoma-Klone wurden in Massenkulturen vermehrt und die MCA aus den Kulturüberständen durch Präzipitation mit Ammoniumsulfat angereichert und/oder durch Affinitäts-Chromatographie an Protein A- Sepharose gereinigt und ihre Immunoglobulin-Klasse und Antigen-Spezifität charakterisiert.

6. Die gegen TMV *vulgare* hergestellten MCA zeigten im ELISA keine Kreuzreaktivität mit ArMV und PLRV. Anhand der Reaktivität mit dem Nukleokapsid und/oder den Proteinmonomeren konnten gemeinsame antigene Determinanten (Epitope) der TMV-Stämme *vulgare*, *dahlemense* und Holmes'Ribgrass festgestellt werden. Durch die Bindung eines MCA an das chemisch synthetisierte C-terminale Tetrapeptid von TMVP konnte die Infektiosität von TMV spezifisch neutralisiert werden.

7. Anhand der Reaktivität von MCA gegen ArMV konnten bei jeweils mehreren ArMV-Stämmen gemeinsame antigene Determinanten unterschieden und die Präsenz von mindestens 6 distinkten Epitopen von ArMV gezeigt werden. Die MCA zeigten Kreuzreaktivität mit verschiedenen PLRV-Isolaten, sowie TMV und TMVP.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ALTSCHUH, D. and VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1982). Localisation of antigenic determinants of a viral protein by inhibition of ELISA with tryptic peptides. *J.Immunol.Methods* 50, 99-108.

ALTSCHUH, D., HARTMAN, D., REINBOLDT, J. and VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1983). Immunochemical studies of tobacco mosaic virus - V. Localization of four epitopes in the protein subunit by inhibition tests with synthetic peptides and cleavage peptides from three strains. *Molec.Immunol.* 20, 271-278.

ANDERER, F.A. und HANDSCHUH, D. (1962). Die Reihenfolge der Aminosäuren im Protein des Tabakmosaikvirus - IV. Spaltung des Tabakmosaikvirusproteins mit Trypsin. *Z.Naturforschg.* 17b, 536-543.

ANDERER, F.A. and SCHLUMBERGER, H.D. (1965). Properties of different artificial antigens immunogenically related to TMV. *Biochim.Biophys.Acta* 97, 503-509.

ANDERER, F.A., WITTMANN-LIEBOLD, B. und WITTMANN, H.G. (1965). Weitere Untersuchungen zur Aminosäuresequenz des Proteins im Tabakmosaikvirus. *Z.Naturforschg.* 20b, 1203-1213.

ANDERER, F.A. and SCHLUMBERGER, H.D. (1966). Zur immunologischen Spezifität der Antiseren gegen terminale Aminosäure-Sequenzen von zwei Stämmen des Tabakmosaikvirus. *Z.Naturforschg.* 21b, 602-603.

ANDERER, F.A., SCHLUMBERGER, H.D. and FRANK, H. (1967). A serological screening method for the detection of free C-terminal amino acids in virus coat protein. *Biochim.Biophys.Acta* 140, 80-92.

ANDERER, F.A. and STRÖBEL, G. (1972). Recognition of conjugated and native peptide determinants. I. Conformational and sequential specificities of rabbit antibodies versus Tobacco Mosaic Virus. *Eur.J.Immunol.* 2, 274-277.

AVRAMEAS, S. (1983). Enzyme immunoassays and related techniques: development and limitations. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 104, 93-99.

BENJAMINI, E., MICHAELI, D. and YOUNG, J.D. (1972). Antigenic determinants of proteins of defined sequences.
Curr.Top.Microbiol.Immunol. 58, 85-134.

BLOOMER, A.C., CHAMPNESS, J.N., BRICOGNE, G., STADEN, R. and KLUG, A. (1978). Protein disk of Tobacco Mosaic Virus at 2.8 Å resolution showing the interaction within and between subunits.
Nature 276, 362-368.

BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal.Biochem. 72, 248-254.

BRIAND, J.P., AL MOUDALLAL, Z. and VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1982). Serological differentiation of tobamoviruses by means of monoclonal antibodies.
J.Virol.Meth. 5, 293-300.

CHAN, W.L. and MITCHINSON, N.A. (1982). The use of somatic cell hybrids for the production of monospecific viral antibodies.
Laboratory and Research Methods in Biology and Medicine 5: New developments in practical Virology, 125-141.

CHANG, T.H., STEPLEWSKI, Z. and KOPROWSKI, H. (1980). Production of monoclonal antibodies in serum free medium.
J.Immunol.Meth. 39, 369-375.

CHU, P.W.G. and FRANCKI, R.I.B. (1979). The chemical subunit of Tobacco Ringspot Virus coat protein.
Virology 93, 398-412.

CIOCCA, D.R., ADAMS, D.J., BJERCKE, R.J., SLEDGE, G.W., EDWARDS, D.P., CHAMNESS, G.C. and McGUIRE, W.L. (1983). Monoclonal antibody storage conditions, and concentration effects on histochemical specificity.
J.Histochem.Cytochem. 31, 691-696.

CLAFLIN, L. and WILLIAMS, K. (1978). Mouse myeloma - spleen cell hybrids: Enhanced hybridization frequencies and rapid screening procedures.
Curr.Top.Microbiol.Immunol. 81, 107-109.

CLARK, M.F. and ADAMS, A.N. (1976). Laboratory notes on the ELISA technique for plant viruses. East Malling Research Station, Maidstone, Kent.

CLARK, M.F. and ADAMS, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. *J.gen.Virol.* 34, 475-483.

CLARK, M.F. (1981). Immunoassays in plant virology. in: Immunoassays for the 80s, 481-494; eds.: Voller, Bidwell & Bartlett; MTP Press.

CRAWFORD, L., LEPPARD, K., LANE, D. and HARLOW, E. (1982). Cellular proteins reactive with monoclonal antibodies directed against Simian Virus 40 T-Antigen. *J.Virol.* 42, 612-620.

DIETZGEN, R.G. (1981). Herstellung von Pflanzenvirus-Antikörper sekretierenden Hybridzellkulturen. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Universität Tübingen.

DIETZGEN, R.G. and SANDER, E. (1981). Production of monoclonal antibodies against a plant virus. Abstr. V. Intl. Virologie-Kongress, Straßburg.

DIETZGEN, R.G. and SANDER, E. (1982). Monoclonal antibodies against a plant virus. *Arch.Virol.* 74, 197-204.

EHRLICH, P.H., MOYLE, W.R., MOUSTAFA, Z.A. and CANFIELD, R.E. (1982). Mixing of two monoclonal antibodies yields enhanced affinity for antigen. *J.Immunol.* 128, 2709-2713.

ENGVALL, E. and PERLMANN, P. (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J.Immunol.* 109, 129-135.

EY, P.L., PROWOSE, S.J. and JENKINS, C.R. (1978). Isolation of pure IgG_1, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using Protein A - Sepharose *Immunochemistry* 15, 429-436.

FAZEKAS DE ST. GROTH, S. and SCHEIDEGGER, D. (1980). Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics. *J.Immunol.Meth.* 35, 1-21.

FAZEKAS DE ST. GROTH, S. (1983). Automated production of monoclonal antibodies in a cytostat. *J.Immunol.Meth.* 57, 121-136.

FEDER, J. und TOLBERT, W.R. (1983). Säugerzellen in Massenkultur. *Spektrum der Wissenschaft* 3, 44-52.

FRAENKEL-CONRAT, H. (1957). Degradation of Tobacco Mosaic Virus with acetic acid.
Virology 4, 1-4.

FUNATSU, G., TSUGITA, A. and FRAENKEL-CONRAT, H. (1964). Studies of the amino acid sequence of Tobacco Mosaic Virus. V. Amino acid sequences of two peptides from tryptic digests and location of amide group.
Arch.Biochem.Biophys. 105, 25-41.

GEIGY, J.R. (1968). Dokumenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 7. Auflage, 274-276, Basel, Schweiz.

GERHARD, W., YEWDELL, J. and FRANKEL, M.E. (1981). Antigenic structure of influenza virus haemagglutinin defined by hybridoma antibodies.
Nature 290, 713-716.

GIBBS, A.J. (1977). Tobamovirus Group.
Descriptions of plant viruses No. 184.

GODING, J.W. (1980). Antibody production by hybridomas.
J.Immunol.Meth. 39, 285-308.

GOODING, G.V. and HEBERT, T.T. (1967). A simple method for purification of tobacco mosaic virus in large quantities.
Phytopath. 57, 1285.

GUGERLI, P. (1979). Potato Virus A and Potato Leafroll Virus: Purification, antiserum production and serological detection in potato and test plants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
Phytopath.z. 96, 97-107.

GUGERLI, P. (1982). Proc. CIP Decennial Anniversary Congress "Research for the Potato in the Year 2000".

GURNEY, E.G., HARRISON, R.O., FENNO, J. (1980). Monoclonal antibodies against simian virus 40 T antigens: Evidence for distinct subclasses of large T antigen and for similarities among nonviral T antigens.
J.Virol. 34, 752-763.

HÄMMERLING, G.J. (1977). T lymphocyte tissue culture lines produced by cell hybridization.
Eur.J.Immunol. 7, 743-746.

HÄMMERLING, G.J. (1980). Protocol for cell hybridization of immunocompetent cells. Persönliche Mitteilung.

HÄMMERLING, G.J. and HÄMMERLING, U. (1981). Production of antibody-producing hybridomas in the rodent system.
Research Monographs in Immunology 3, 563-587.

HALK, E.L., HSU, H.T., AEBIG, J. and CHANG, K. (1982a). Hybridomas producing monoclonal antibodies against Prunus Necrotic Ringspot (NRSV) and Apple Mosaic (ApMV) Viruses.
Phytopath. 72, 707.

HALK, E.L., HSU, H.T., AEBIG, J. and CHANG, K. (1982b). Production of hybrid cell lines secreting virus specific monoclonal antibodies to three ILARviruses and Alfalfa Mosaic Virus.
Phytopath. 72, 938, Abstr. 75.

HALK, E.L., HSU, H.T. and AEBIG, J. (1982c). Properties of virus specific monoclonal antibodies to Prunus Necrotic Ringspot (NRSV), Apple Mosaic (ApMV), Tobacco Streak (TSV) and Alfalfa Mosaic Viruses.
Phytopath. 72, 953, Abstr. 189.

HALK, E.L. and FRANKE, J. (1983). Identification of serological types of Apple Mosaic, Prunus Necrotic Ringspot and Tobacco Streak Viruses with monoclonal antibodies. 75. meeting of the American Phytopathological Society, Ames, Iowa.
Phytopath. 73, 789, Abstr. 182.

HARDIE, G. and VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1977). Isolation of specific antibody under conditions of low ionic strength.
J.Immunol.Meth. 15, 305-314.

HARRISON, B.D. and NIXON, H.L. (1960). Purification and electron microscopy of three soil-borne plant viruses.
Virology 12, 104-117.

HIRTH, L. and RICHARDS, K.E. (1981). Tobacco Mosaic Virus. Modell for structure and function of a simple virus.
Adv.Virus Res. 26, 145-199.

HOLLINGS, M. and HUTTINGA, H. (1976). Tomato mosaic virus.
Descriptions of plant viruses No. 156.

HSU, H.T., AEBIG, J., ROCHOW, W.F. and LAWSON, R.H. (1983a). Isolations of hybridomas secreting antibodies reactive to RPV and MAV isolates of Barley Yellow Dwarf Virus and Carnation Etched Ring Virus. 75. APS meeting, Ames, Iowa.
Phytopath. 73, 790, Abstr. 191.

HSU, H.T., HALK, E.L. and LAWSON, R.H. (1983b). Monoclonal antibodies in plant virology. Intl. Plant Pathology Congress, Australien.

HSU, H.T., LAWSON, R.H., BEIJERSBERGEN, J.C.M. and DERKS, A.F.L.M. (1983c). Murine hybridomas secreting antibodies specific to Carnation Etched Ring and Tulip Breaking Viruses.
Intl. Plant Pathology Congress, Australien.

ISCO TABLES (1974). 5.ed., 32-33.

JONAK, Z.L. (1980). Isolation of monoclonal antibodies from supernatant by $(NH_4)_2SO_4$ precipitation.
In: Monoclonal Antibodies. Eds. Kennet, McKearn and Bechtol. Plenum Press, 405-406.

KEARNEY, J.F., RADBRUCH, A., LIESEGANG, B. and RAJEWSKY, K. (1979). A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines.
J.Immunol. 123, 1548-1550.

KLASEN, E.A., RIGUTTI, A., BOS, A. and BERNINI, L.F. (1983). Development of a screening system for detection of somatic mutations. II. The use of peptides and insoluble protein fragments in a non-competitive solid-phase enzyme immunoassay.
J.Immunol.Meth. 59, 281-287.

KLUG, A. and CASPAR, D.L.D. (1960). The structure of small viruses.
Adv.Vir.Res. 7, 225-325.

KLUG, A. and DURHAM, A.C.H. (1971). The disk of TMV protein and its relation to the helical and other modes of aggregation.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. XXXVI, 449-460.

KÖHLER, G. and MILSTEIN, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.
Nature 256, 495-497.

KÖHLER, G., and MILSTEIN, C. (1976). Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion.
Eur.J.Immunol. 6, 511-519.

KÖHLER, G., HOWE, S.C. and MILSTEIN, C. (1976). Fusion between immunoglobulin-secreting and non-secreting myeloma cell lines.
Eur.J.Immunol. 6, 292-295.

KOENIG, R. (1981). Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses.
J.gen.Virol. 55, 53-62.

KRCZAL, H. (1965). Das Arabis Mosaik Virus, ein gefährlicher Krankheitserreger der Kulturerdbeere.
Der Erwerbsobstbau, 7.Jahrgang, Heft 7, 121-123.

LEE, P.W.K., HAYES, E.C., JOKLIK, W.K. (1981). Characterization of anti-reovirus immunoglobulins secreted by cloned hybridoma cell lines.
Virology 108, 134-146.

LEHTONEN, O.-P. and EEROLA, E. (1982). The effect of different antibody affinities on ELISA absorbance and titer.
J.Immunol.Meth. 54, 233-240.

LERNER, R.A. (1982). Tapping the immunological repertoire to produce antibodies of predetermined specificity.
Nature 299, 592-596.

LUTZ, H., PEDERSEN, N.C., DURBIN, R. and THEILEN, G.H. (1983). Monoclonal antibodies to three epitopic regions of Feline Leukemia Virus p27 and their use in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of p27.
J.Immunol.Meth. 56, 209-220.

MATTHEWS, R.E.F. (1982). Classification and nomenclature of viruses.
Intervirology 17.

McCULLOUGH, K.C. and BUTCHER, R. (1982). Monoclonal antibodies against Foot-and Mouth Disease Virus 146S and 12S particles.
Arch.Virol. 74, 1-9.

MELCHERS, G. (1940). Die biologische Untersuchung des "Tomatenvirus Dahlem 1940".
Biol.Zbl. 60, 527-537.

MILTON, R.C. de L. and VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1979). Immunochemical studies of Tobacco Mosaic Virus - III. Demonstration of five antigenic regions in the protein subunit.
Molec.Immunol. 16, 179-184.

MILTON, R.C. de L., MILTON, S.C.F., VAN WECHMAR, M.B. and VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1980). Immunochemical studies of TMV - IV. Influence of single amino acid exchanges on the antigenic activity of mutant coat proteins and peptides.
Molec.Immunol. 17, 1205-1212.

MISHELL, B. and SHIIGI, S.M. (1980). Selected methods in cellular immunology, 278-286. W.H. Freeman & Co., San Francisco.

MURANT, A.F. (1981). Nepoviruses. In: Kurstak - Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis, 198-238 (Elsevier/North Holland).

NERMUT, M.V (1973). Methoden der Negativkontrastierung. In: Methodensammlung der Elektronenmikroskopie, Teil 3.1.2.3, Wiss.Verlagsges., Stuttgart.

NOORDAM, D. (1973). Identification of plant viruses. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, Holland.

NOWINSKI, R.C., LOSTROM, M.E., TAM, M.R., STONE, M.R. and BURNETTE, W.N. (1979). The isolation of hybrid cell lines producing monoclonal antibodies against the p15(E) protein of Ecotropic Murine Leukemia Viruses.
Virology 93, 111-126.

OSHIMA, N. and HARRISON, B.D. (1975). Ribgrass Mosaic Virus.
Descriptions of plant viruses No. 152.

OXFORD, J. (1982). The use of monoclonal antibodies in virology.
J.Hyg. 88, 361-368.

QUESNIAUX, V., BRIAND, J.-P. and VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1983). Immunochemical studies of Turnip Yellow Mosaic Virus - II. Localization of a viral epitope in the N-terminal residues of the coat protein.
Molec.Immunol. 20, 179-185.

PRATT, D., BRIAND, J.-P. and VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1980). Immunochemical studies of Turnip Yellow Mosaic Virus - I. Localization of four antigenic regions in the protein subunit.
Molec.Immunol. 17, 1167-1171.

ROCHOW, W.F. and DUFFUS, J.E. (1981). Luteoviruses and yellow diseases. In: Kurstak - Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis, 147-170.

ROWHANI, A. and STACE-SMITH, R. (1979). Purification and characterization of potato leafroll virus.
Virology 98, 45-54.

SCHÄFER, W. (1979). Der Mäuse-Inzuchtstamm STU. Entwicklung und Eigenschaften.
Z.Naturforschg. 34c, 306-309.

SCHARFF, M.D. and ROBERTS, S. (1981). Present status and future prospects for the hybridomas technology.
In vitro 17, 1072 - 1077.

SCHREIER, M., KÖHLER, G., HENGARTNER, H., BEREK, C., TRUCCO, M., FORNI, L., STAEHELIN, T., STOCKER, J., and TAKACS, B. (1980). Hybridomas techniques.
EMBO, SKMB Course, Basel.

SELA, M. (1969). Antigenicity: some molecular aspects.
Science 166, 1365-1374.

STEPANOV, V., HANDSCHUH, D. and ANDERER, F.A. (1961). Peptidtrennung mit Sephadex.
Z.Naturforschg. 16b, 626-627.

TAKANAMI, I. and KUBO, S. (1979). Enzyme-assisted purification of two phloem-limited plant viruses: Tobacco Necrotic Dwarf and Potato Leafroll.
J.gen.Virol. 44, 153-159.

TSUGITA, A., GISH, D.T., YOUNG, J., FRAENKEL-CONRAT, H., KNIGHT, C.A. and STANLEY, W.M. (1960).
The complete amino acid sequence of the protein of Tobacco Mosaic Virus.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 46, 1463-1469.

UNDERWOOD, P.A., KELLY, J.F., HARMAN, D.F. and MacMILLAN, H.M. (1983). Use of Portein A to remove immunoglobulins from serum in hybridoma culture media.
J.Immunol.Meth. 60, 33-45.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. and LELARGE, N. (1973). The antigenic specificity of different states of aggregation of Tobacco Mosaic Virus protein. *Virology* 52, 89-104.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. and HARDIE, G. (1976). Immunochemical studies of TMV - II. Univalent and monogamous bivalent binding of IgG antibody. *Immunochemistry* 13, 503-507.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. and BURCKARD, J. (1980). Detection of a wide spectrum of Tobacco Mosaic Virus strains by indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Virology* 106, 327-334.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1981). Tobamoviruses. In: Kurstak - Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis, 541-564.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1982). Serology and immunochemistry of plant viruses. Academic Press.

VOLLER, A., BIDWELL, D.E., and BARTLETT, A. (1976). Enzyme immunoassays in diagnostic medicine: Theory and practice. *Bull.WHO* 53, 55-65.

WALTER, C. und SANDER, E. (1979). Vergleich des "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) zum Nachweis von Kartoffel-Y-Virus mit dem konventionellen Biotest auf Solanum demissum A6. *Z.Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 86, 662-666.

VON WECHMAR, M.B. and VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1968). Serological studies on Bromgrass Mosaic Virus and its protein fragments. *Virology* 34, 36-45.

WATERWORTH, H.E. (1975). Purification of Arabis Mosaic Virus isolated from Jasmine plant introduction. *Phytopath.* 65, 927-928.

WILLIAMS, A.R. (1978). Isoelectric focussing of immunoglobulins. In: *Handbook of Exp.Immunol.*, 3.ed., Vol 1, 9.

YEWDELL, J.W. and GERHARD, W. (1981). Antigenic characterization of viruses by monoclonal antibodies. *Ann.Rev.Microbiol.* 35, 185-206.

ZAITLIN, M. (1975). Tobacco Mosaic Virus (Type strain). *Descriptions of plant viruses* No. 151.

VII. ABKÜRZUNGEN UND GLOSSAR

1. Abkürzungen

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ArMV	Arabis Mosaik Virus
ArMVP	Hüllprotein von ArMV
ATCC	American Type Culture Collection
CL	cross-linker
CP	Coating Puffer
CPP	Citrat-Phosphat-Puffer (McIlvaine)
cv	cultivar
d	Tag
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMA	Enzym-markierte Antikörper
et al.	und andere
Ext.	Extinktion
FCS	Fötales Kälberserum
h	Stunde
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
HSA	Humanserumalbumin
HT	Hypoxanthin-Thymidin
Ig	Immunoglobulin
i.v.	intravenös
Kan.	Kaninchen
Läs.	Lokalläsion
LTP	lösliche native tryptische Peptide von TMVP
M	Molarität
mAk	monospezifischer, polyklonaler Antikörper
MØ	Makrophage

MCA	monoklonaler Antikörper
MG (d)	Molekulargewicht in dalton
min	Minute
NS	Normalserum, d.h. Serum von nicht immunisierten Tieren
p.a.	zur Analyse
PA-Ig	Protein A-reaktive Immunoglobuline
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PEG	Polyethylenglykol
PL	Polylysin
PLRV	Potato Leafroll Virus (Kartoffel Blattroll Virus)
p.s.	zur Synthese
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVX	Potato Virus X (Kartoffelvirus X)
RNA	Ribonukleinsäure
RSA	Rinderserumalbumin
s.c.	subcutan
SPP	Sörensen-Phosphatpuffer
STP	chemisch synthetisiertes C-terminales Tetrapeptid H_2N-Gly-Pro-Ala-Thr-OH von TMVP
TMV	Tabak Mosaik Virus
TMVP	Hüllprotein von TMV
TP	natives tryptisches Peptid von TMVP
Upm	Umdrehungen pro Minute

2. Glossar

→	"Funktionspfeil": gerichtet "gegen" ein spezifisches Antigen
Antiglobulin	Antikörper gegen γ-Globuline (Antikörper) einer anderen Tierspezies
Ak-Affinität	Stärke der Bindung eines monovalenten Ak an eine einzelne antigene Determinante
Ak-Titer	Diejenige Verdünnung eines Antiserums, deren Reaktion im ELISA noch eine $Ext._{405nm}$ ergab, die über dem gewählten Grenzwert lag.
Coating	Beschichtung von Polystyrol-Mikroelisa-Platten mit Ag oder Ak für den ELISA
Cryptotop	Epitop der Protein-Untereinheit eines Virus, das im Viruspartikel jedoch verborgen oder nicht vorhanden ist
Epitop	Antigene Determinante; Kombination von Aminosäuren an der Oberfläche eines viralen Hüllproteins, an die Ak binden können
Epityp	Epitope, mit denen ein gegebenes Paratop kreuzreagiert
γ-Globuline	Polyklonale Antikörper in Form der gereinigten γ-Globulinfraktion eines Serums
Hybridomas	somatische Zellhybride; Hybridzellen aus einer Milz- und einer Myelomzelle
Hybridoma-Ak	von Hybridomas *in vitro* produzierte Ak

Isotyp	Klasse und Subklasse eines Ak
Neotop	Epitop in Viruspartikeln, das in der Protein-Untereinheit fehlt
Normalserum	Serum von nicht-immunisierten Tieren
Paratop	Struktur der Antigen-Bindungsstelle von Ak
PA-Ig	Protein A - reaktive Immunoglobuline; Ak der IgG-Klasse, die an Protein A binden
Reaktivität	$Ext._{405nm}$ in einem definierten ELISA-System
spezifische Aktivität	Zunahme der $Ext._{405nm}$/h/100 µg MCA
monospezifische, polyklonale Ak	ausschliesslich Antigen-spezifische, durch Adsorption polyklonaler Ak an das Antigen gewonnene Ak (vergl. Methoden 2.6)

Lebenslauf

Name, Vorname:	Dietzgen, Ralf Georg
Geboren:	05. März 1955 in Freiburg/Breisgau
Eltern:	Alfred Dietzgen und Erika Dietzgen, geb. Rausch
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Schulausbildung:	
1962 bis 1966	Volksschule Freiburg-Littenweiler
1966 bis 1974	Kepler-Gymnasium Freiburg
Juni 1974	Reifeprüfung
Studium:	
1974 bis 1976	Universität Konstanz, Studienfach Biologie; Vordiplom
1976 bis 1979	Universität Tübingen, Studienfächer Mikrobiologie, Genetik, Biochemie, Parasitologie
1980 bis 1981	Diplomarbeit am Institut für Biologie II unter Leitung von Prof. Dr. E. Sander
April 1981	Biologie-Diplom
1981 bis 1983	Dissertation am Institut für Biologie II unter Leitung von Prof. Dr. E. Sander von Mai 1981 bis Juni 1983

Meine akademischen Lehrer waren:

in Konstanz:	Adam, Böger, Knippers, Läuger, Markl, Pette, Weiler
in Tübingen:	Bessler, Braun, Frank, Guglielmi, Hemleben, Klee, Löffler, Meier-Brook, Sander, Seyffert, Wenk, Zähner

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353